

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

TESIS DOCTORAL

**Nuevas Aproximaciones a la Terapia
Génica de la Ataxia de Friedreich con el
Locus Genómico de la Frataxina**

Iván Fernández Frías

Madrid, 2017



Memoria de Investigación presentada por

Iván Fernández Frías

Para optar al grado de

Doctor

por la Universidad Autónoma de Madrid

Trabajo co-dirigido por el

Dr. Javier Díaz-Nido

Profesor Titular del Departamento de Biología Molecular de la

Universidad Autónoma de Madrid

y la **Dra. Sara Pérez-Luz**

Investigadora del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”

La presente tesis ha sido realizada en el

Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (UAM-CSIC)





Javier Díaz-Nido, Profesor Titular del Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, y **Sara Pérez-Luz**, Investigadora del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”

INFORMAN:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada “*Nuevas aproximaciones a la terapia génica de la ataxia de Friedreich con el locus genómico de la frataxina*”, ha sido realizada por Iván Fernández Frías bajo nuestra dirección, estimando que se encuentra concluida y en condiciones de ser presentada y defendida públicamente para optar al grado de Doctor.

Y para que conste, firmamos la presente autorización en Madrid a 11 de junio de 2017

Fdo. Javier Díaz-Nido

Fdo. Sara Pérez-Luz

El trabajo de laboratorio realizado por Iván Fernández Frías ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2012-38042), la Plataforma para la Cura de la Ataxia de Friedreich (GENEFA) y *Friedreich's Ataxia Research Alliance* (FARA).

A mi familia

ÍNDICE

ABREVIATURAS	19
RESUMEN	27
SUMMARY	31
INTRODUCCIÓN	35
1. ATAXIA DE FRIEDREICH	37
1.1. Clínica de la ataxia de Friedreich	37
1.2. Bases moleculares de la AF	38
1.3. Estructura y función de la frataxina	39
1.4. Regulación del gen de la frataxina	41
1.4.1. Cambios regulatorios causados por la expansión	43
2. TERAPIA GÉNICA	48
2.1. Aspectos generales de la terapia génica	48
2.2. Terapia génica en las enfermedades neurodegenerativas	49
2.2.1. Barrera hematoencefálica	49
2.2.2. Vías de administración	51
2.3. Vectores usados en terapia génica	52
2.3.1. Vectores virales	52
2.3.2. Vectores no virales	55
2.3.2.1. Vectores NV basados en métodos químicos (nanopartículas)	56
2.4. Terapia génica en la AF	57
OBJETIVOS	60
MATERIALES Y MÉTODOS	64
1. CULTIVOS CELULARES	66
1.1. Cultivo de líneas celulares	66
1.2. Diferenciación de la línea celular SH-SY5Y	66
1.3. Cultivo primario de neuronas de corteza cerebral de ratón	67
1.4. Cultivo de células troncales de la mucosa olfativa humana	67
2. GENERACIÓN DE VECTORES HSV-1	68
2.1. Obtención de plásmidos y BACs	68

2.2.	Producción de vectores HSV-1	68
2.3.	Titulación de vectores HSV-1	70
2.4.	Transducción de las células diana	71
3.	TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE MUESTRAS CELULARES Y TISULARES	71
3.4.	<i>Western-blot</i>	71
3.5.	Fraccionamiento celular	72
3.6.	RT-PCR	73
3.7.	Viabilidad celular	73
3.8.	Tinción X-Gal Violeta	74
3.9.	Inmunofluorescencia	74
4.	TÉCNICAS CON ANIMALES	75
4.1.	Animales de experimentación	75
4.2.	Inyección estereotáxica	75
4.3.	Extracción y procesado de órganos	76
5.	TÉCNICAS DE ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	76
6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	77
	RESULTADOS	78
1.	Estudio de los elementos reguladores en el <i>locus</i> genómico del gen FXN a partir de las bases de datos ENCODE y Roadmap	80
1.1.	Estudio en las líneas celulares ofrecidas por el consorcio ENCODE	80
1.2.	Estudio en los tejidos y cultivos primarios ofrecidos por el consorcio Roadmap	83
1.2.1.	Marcas epigenéticas sin variación entre muestras tisulares	83
1.2.2.	Marcas epigenéticas de zonas <i>enhancer</i>	85
2.	Expresión de las isoformas de FXN por el vector BAC-FXN	87
2.1.	Expresión de las isoformas en células N2A de neuroblastoma de ratón	88
2.2.	Expresión de las isoformas <i>in vivo</i> en cerebelo de ratón	89
2.3.	Expresión de las isoformas en células troncales de la mucosa olfativa humana	90
3.	Mejora del proceso de generación y purificación de vectores HSV-1	92
3.1.	Obtención de una nueva línea celular estable para el gen anti-apoptótico Bcl2.	93
3.2.	Optimización del medio de cultivo de las células empaquetadoras.	94
3.3.	Mejora de la eficiencia de empaquetamiento de un BAC en vectores HSV-1	95
4.	Modificación de vectores HSV-1 para su uso en terapia génica de la AF	97

4.1.	Modificación y caracterización de vectores HSV-1 a pequeña escala	97
4.2.	Evaluación de la eficiencia del proceso de modificación de vectores HSV-1 a mayor escala	99
5.	Nanopartículas funcionalizadas: nueva estrategia de terapia génica para la AF	101
5.1.	Generación de nanopartículas funcionalizadas	101
5.2.	Elección del método de generación de NPs	102
5.3.	Determinación de la formulación y tiempo óptimos	104
5.4.	Ensayos <i>in vitro</i> en cultivos de células neuronales	105
5.4.1.	Ensayos en células similares a neuronas humanas	106
5.4.2.	Ensayos en cultivos primarios de neuronas de ratón	107
5.5.	Ensayos <i>in vivo</i> : inyecciones directas en cerebelos de ratón	110
5.5.1.	Funcionalidad y distribución de las NPs <i>in vivo</i>	110
5.5.2.	Determinación del tipo celular en el que las NPs se internalizan	112
5.6.	NPs portadoras el <i>locus</i> completo del gen FXN	112
	DISCUSIÓN	116
1.	Terapia génica con el <i>locus</i> genómico de la frataxina	118
2.	Vectores HSV-1 modificados: una estrategia para la terapia génica de la AF por optimizar	120
3.	Nanopartículas funcionalizadas: una posible alternativa para la terapia génica de la AF	124
	CONCLUSIONES	130
	BIBLIOGRAFÍA	134
	ANEXO	152

ABREVIATURAS

(GAA)_n: Expansión del triplete guanina-adenina-adenina

AAV: *Adeno-associated Virus* / Virus adeno-asociados

ABC: *ATP-binding Cassette transporter* / Transportador de unión a ATP

ACSF: *Artificial Cerebrospinal Fluid* / Líquido cefalorraquídeo artificial

Ad: Adenovirus

AF: Ataxia de Friedreich

ARCA: *Autosomal Recessive Cerebellar Ataxia* / Ataxia cerebelar autosómica recesiva

ARE: *Antioxidant Response Element* / Elemento de respuesta antioxidante

ATP: Adenosina Trifosfato

BAC: *Bacterial Artificial Chromosome* / Cromosoma artificial de bacteria

BDNF: *Brain-Derived Neurotrophic Factor* / Factor neurotrófico derivado de cerebro

BHE: Barrera hematoencefálica

BMVEC: *Brain Microvascular Endothelial Cell* / Célula endotelial de los microvasos cerebrales

cDNA: *Complementary DNA* / ADN complementario

CGI: *Cytosine-Phosphoguanine site Island* / Isla de residuos citosina-fosfoguanina

CpG: *Cytosine-Phosphoguanine site* / Residuos citosina-fosfoguanina

CPP: *Cell Penetrating Peptide* / Péptido de penetración celular

CSF: *Cerebrospinal Fluid* / Líquido cefalorraquídeo

CTCF: *CCCTC-binding Factor* / Factor de unión a CCCTC

ChIP-Seq: *Chromatin Immunoprecipitation followed by high-throughput DNA Sequencing* / Inmunoprecipitación de la cromatina seguida de secuenciación masiva de ADN

DAPI: *4'-6-diamidine-2-phenylindole* / 4'-6-diamino-2-fenilindol

dbcAMP: *O-dibutyryl adenosine 3':5' cyclic monophosphate* / Monofosfato cíclico 3':5' O-dibutiriladenosina

DCN: *Deep Cerebellar Nuclei* / Núcleos profundos del cerebelo

DSL: *Dynamic Light Scattering* / Dispersión de Luz Dinámica

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium* / Medio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: *Deoxyribonucleic Acid* / Ácido desoxirribonucleico

DNasa: Deoxirribonucleasa

DNMT: *DNA Methyltransferase* / Metiltransferasa del ADN

DPE: *Downstream Promoter Element* / Elemento promotor por detrás

DRG: *Dorsal Root Ganglion* / Ganglio de la raíz dorsal

EBNA-1: *Epstein-Barr Nuclear Antigen-1* / Antígeno nuclear 1 del Epstein-Barr

E-box: *Enhancer-box* / Caja amplificadora

EDTA: *Ethylenedinitrilotetraacetic Acid* / Ácido etilendiaminotetraacético

EGR3: *Early Growth Response factor 3* / Factor de respuesta temprana al crecimiento 3

EMA: *European Medicines Agency* / Agencia Europea del Medicamento

ENCODE: *ENCyclopedia Of DNA Elements* / Enciclopedia de elementos del ADN

EV: *Extracellular Vesicle* / Vesícula extracelular

FAST1: *FXN Antisense Transcript 1* / Tránsito antisentido del gen FXN 1

FBS: *Fetal Bovine Serum* / Suero bovino fetal

FDA: *US Food and Drug Administration* / Administración de Alimentos y Medicamentos de EEUU

FXN: Gen / proteína frataxina

GABA: *γ-Aminobutyric Acid* / Ácido γ-aminobutírico

GAPDH: *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase* / Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GFAP: *Glial Fibrillary Acidic Protein* / Proteína fibrilar ácida de la glia

GFP: *Green Fluorescent Protein* / Proteína verde fluorescente

GLUT-1: *Glucose Transporter 1* / Transportador de la glucosa 1

HAT: Histona Acetiltransferasa

HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution* / Solución salina equilibrada de Hank

HDAC: Histona Deacetiltransferasa

HEPES: *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid* / Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfónico

HGUGM: Hospital General Universitario Gregorio Marañón

HMT: Histona Metiltransferasa

HP1: *Heterochromatin Protein 1* / Proteína de la heterocromatina 1

hrEGF: *Human recombinant Epidermal Growth Factor* / Factor de crecimiento epidermal recombinante humano

hrFGF-2: *Human recombinant Fibroblast Growth Factor 2* / Factor de crecimiento de fibroblastos recombinante humano 2

HSV-1: *Herpes Simplex Virus 1* / Virus del herpes simple 1

IE2: *Immediate Early gene 2* / Gen de expresión inmediata temprana 2

iPSC: *induced Pluripotent Stem Cell* / Células madre pluripotentes inducidas

ISC: *Iron Sulfur Cluster* / Centro hierro-azufre

ISCU: *Iron-Sulfur Cluster assembly enzyme* / Proteína de ensamblaje de los centro hierro-azufre

LB: Caldo Luria-Bertani

LIF: *Leukemia Inhibitory Factor* / Factor inhibitorio de la leucemia

LINE: *Long Interspersed Nuclear Element* / Elemento nuclear intercalado largo

LV: Lentivirus

MER1: *primate-specific MEdium Reiteration 1 element* / Elemento de reiteración del medio 1 específico de primates

miRNA: *Micro RNA* / Micro ARN

MOI: *Multiplicity Of Infection* / Multiplicidad de infección

MPP: *Mitochondrial Processing Protease* / Peptidasa de procesamiento mitocondrial

mRNA: *Messenger RNA* / ARN mensajero

NFE2L2: *Nuclear Factor (Erythroid-derived 2)-Like 2* / Factor nuclear (similar al derivado de eritrocitos-2) tipo 2

NGF: *Nerve Growth Factor* / Factor de crecimiento nervioso

- NIH:** *National Institutes of Health of US* / Institutos Nacionales de Salud de EEUU
- NIL:** *Non-integrating Lentiviral vector* / Vector lentiviral no integrador
- NP:** Nanopartícula
- NV:** No viral
- OMSC:** *Olfactory Mucosal Stem Cell* / Célula troncal de la mucosa olfativa
- P53RE:** *p53 Responsive Element* / Elemento de respuesta a p53
- PBS:** *Phosphate Buffered Saline solution* / Tampón fosfato salino
- PEG:** Polietilenglicol
- PEI:** Polietilenimina
- PFGE:** *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* / Electroforesis en gel de campo pulsado
- P-gp:** *P-glycoprotein* / Glicoproteína P
- PLGA:** *Poly-lactide-co-glycolide Acid* / Poli (ácido láctico-co-glicólico)
- PPAA:** *Poly(propylacrylic Acid)* / Poli (ácido propilacrílico)
- PTM:** *Post-translational Modification* / Modificación postraduccional
- RNA:** *Ribonucleic acid* / Ácido ribonucleico (ARN)
- RNAPII:** *RNA Polymerase II* / Polimerasa de ARN II
- ROS:** *Reactive Oxygen Species* / Especies reactivas de oxígeno
- RT-PCR:** *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* / Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa
- SDS:** *Sodium Dodecyl Sulfate* / Dodecil sulfato sódico
- SINE:** *Short Interspersed Nuclear Element* / Elemento nuclear intercalado corto
- siRNA:** *Small interfering RNA* / ARN pequeño de interferencia
- SNC:** Sistema Nervioso Central
- SRF:** *Serum Response Factor* / Factor de respuesta al suero
- TFAP2:** *Transcriptional Factor AP 2* / Factor de transcripción AP 2
- TJC:** *Tight Junction Complex* / Complejo de uniones estrechas

TSS: *Transcription Start Site* / Sitio de inicio de la transcripción

UTR: *Untranslated Region* / Región no traducida

VIH-1: Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1

YAC: *Yeast Artificial Chormosome* / Cromosoma artificial de levadura

ZFN: *Zinc Finger Nuclease* / Nucleasa con dedos de zinc

RESUMEN

La ataxia de Friedreich (AF) es una enfermedad principalmente neurodegenerativa, de herencia autosómica recesiva y con una prevalencia en Europa de entre 1:20.000 y 1:725.000. Está causada por la deficiencia de la proteína frataxina, debido mayoritariamente por una expansión del trinucleótido GAA en el primer intrón del gen codificante de dicha proteína. En la actualidad, las funciones desempeñadas por la frataxina y sus isoformas continúan sin estar del todo esclarecidas, al igual que el mecanismo por el cual su déficit causa distintos daños, entre ellos la neurodegeneración.

Los estudios sobre la regulación del gen de la frataxina se han centrado principalmente hasta ahora en la región del promotor y en la zona del intrón 1 en la que se produce la expansión. Nosotros hemos realizado un estudio de los elementos reguladores presentes en toda la extensión del *locus* genómico de la frataxina, observándose posibles zonas regulatorias en zonas intergénicas e intrónicas, destacando la parte final del intrón 4 y la región *downstream* más cercana al gen.

Actualmente existen varias estrategias en desarrollo para intentar tratar y curar la AF, siendo una de ellas la terapia génica con vectores virales. Nosotros hemos planteado una estrategia basada en vectores HSV-1, los cuales han sido modificados químicamente para permitir su paso a través de la barrera hematoencefálica (BHE). Este tipo de vectores posee varias ventajas, como su gran capacidad de almacenamiento, lo que permite empaquetar DNAs de gran tamaño, como cromosomas artificiales de bacteria (BACs) con el *locus* genómico de la frataxina. Hemos comprobado que las células transducidas con este tipo de vectores generan las distintas isoformas descritas de la frataxina, tanto en ensayos *in vitro* en células troncales de mucosa olfativa de pacientes de AF, como en ensayos *in vivo* en cerebelos de ratón.

Por otro lado, hemos explorado otra estrategia de terapia génica alternativa al uso de vectores virales. Para ello se han desarrollado nanopartículas formadas por los polímeros PLGA y PEI, y han sido funcionalizadas con un péptido de penetración celular y con un péptido lanzadera que permite su paso a través de la BHE (r8 y rD-THR, respectivamente). Se comprobó su capacidad de internalizar, liberar y expresar el cDNA de la frataxina en cultivos de células similares a neuronas, así como su capacidad de encapsular un BAC con el *locus* genómico de la frataxina, observándose su expresión en cultivos primarios de neuronas de la corteza cerebral de ratón. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que ni los vectores virales ni las nanopartículas modificadas fueron capaces de atravesar la BHE de manera eficiente.

En conclusión, hemos realizado una primera aproximación al uso de vectores HSV-1 modificados y al uso de nanopartículas funcionalizadas como estrategias alternativas a la terapia génica de la ataxia de Friedreich, aunque se requerirá un mayor esfuerzo de investigación para mejorar la distribución de los genes en el sistema nervioso central.

SUMMARY

Friedreich's ataxia (FA) is mainly a neurodegenerative disease with autosomal recessive inheritance and a prevalence in Europe of between 1:20,000 and 1:725,000. It is caused by frataxin deficiency, mainly due to an expansion of the GAA trinucleotide in the first intron of the gene. At present, functions performed by frataxin and its isoforms are still not fully understood, as is the mechanism by which the deficit causes different damages, including neurodegeneration.

So far, studies on gene regulation have been focused on the promoter region and on the region around intron 1 in which the expansion occurs. We have performed a study of the possible regulatory elements throughout the genomic *locus* of frataxin, observing putative regulatory regions in the intergenic and intronic zones, highlighting the final part of intron 4 and the *downstream* region next to the gene.

Currently there are several strategies trying to treat and cure FA, being gene therapy with viral vectors one of them. We have proposed a HSV-1 vector-based strategy, which have been chemically modified to allow their passage through the blood-brain barrier (BBB). This kind of vectors has several advantages, such as its large storage capacity, which allows the packaging of large plasmids such as bacterial artificial chromosomes (BACs) with the genomic *locus* of frataxin. We have verified that cells transduced with this kind of vectors generate the different isoforms of frataxin, both in *in vitro* assays in olfactory mucosa stem cells of FA patients, and in *in vivo* assays in mouse cerebellum.

On the other hand, we have explored another alternative strategy using PLGA and PEI nanoparticles, functionalized with a cellular penetration peptide and a shuttle peptide that allow their passage through the BBB (r8 and rD-THR, respectively). Its ability to internalize, release and express the frataxin cDNA in cultures of neuron-like cells was verified, as well as its ability to encapsulate a BAC with the genomic *locus* of frataxin, observing its expression in primary cultures of mouse cortex neurons. However, our results suggest that neither the modified HSV-1 vectors nor the nanoparticles were able to efficiently cross the BBB.

In conclusion, this is the first approach to the use of modified HSV-1 vectors and functionalized nanoparticles as alternative strategies to the gene therapy of Friedreich's ataxia, although further research is required to improve gene delivery to the central nervous system.

INTRODUCCIÓN

1. ATAXIA DE FRIEDREICH

1.1. Clínica de la ataxia de Friedreich

La ataxia de Friedreich (AF; OMIM #229300; www.omim.org/entry/229300) fue descrita por primera vez en 1863 por Nicholas Friedreich (Friedreich, 1877). Es una enfermedad de herencia autosómica recesiva perteneciente al grupo de enfermedades cerebelosas hereditarias (ARCA, *Autosomal Recessive Cerebellar Ataxias*) (Koeppen and Mazurkiewicz, 2013, Espinos-Armero et al., 2005), las cuales se caracterizan por una degeneración o desarrollo anormal del cerebelo y de la médula espinal.

La prevalencia de la AF en las poblaciones occidentales varía entre 1:20.000 y 1:725.000. Los estudios epidemiológicos muestran un gradiente de prevalencia en Europa de oeste a este, existiendo los niveles más altos en el norte de España e Irlanda y sur de Francia, y los niveles más bajos en Escandinavia y Rusia. Las frecuencias de individuos portadores varían entre 1:55 en el norte de España y 1:336 en Rusia (Vankan, 2013).

La AF es un trastorno progresivo lento, cuyos primeros síntomas aparecen durante la adolescencia. Los síntomas neurológicos de la AF son muy numerosos, siendo el más característico la ataxia temprana. Además, los pacientes también presentan disartria (dificultades en la articulación del lenguaje), diplopía (visión doble), nistagmos (movimiento involuntario e incontrolado de los ojos), disfagia (dificultad en la deglución), rigidez muscular y pérdida de reflejo de las extremidades inferiores (reflejo de Babinski). Los síntomas neurológicos no progresan todos al mismo ritmo, manifestándose la disartria en los primeros 10-15 años de la enfermedad, mientras que la pérdida de propiocepción puede tardar más de 40 años en desarrollarse. Los trastornos afectivos afectan a muchos pacientes, padeciendo depresión grave aproximadamente el 10% de ellos (Burk, 2017).

Existen otros síntomas extraneurológicos, como la cardiomiopatía hipertrófica, que sufren el 70-90% de los pacientes (Regner et al., 2012); diabetes mellitus tipo II, desarrollada por el 30% de los pacientes (Cnop et al., 2013); e intolerancia a la glucosa, que aparece en el 20% de ellos (Finocchiaro et al., 1988). También se observan deterioros en la producción de ATP (Adenosina Trifosfato) mitocondrial en el músculo (Lodi et al., 1999) y el desarrollo de anomalías esqueléticas como el pie cavo o la escoliosis (Labelle et al., 1986).

La esperanza de vida ha mejorado considerablemente en los últimos años, siendo las principales causas de muerte las complicaciones cardíacas (60%), el coma diabético y accidentes cerebrovasculares (De Michele et al., 1996).

En lo que se refiere a la afección neurológica, los estudios neuropatológicos (Koeppen, 2011) y de neuroimagen (Mascalchi et al., 2017) sugieren que en el desarrollo de la enfermedad coexisten dos componentes: por un lado, un trastorno durante el desarrollo que resulta en una atrofia temprana (por hipoplasia) de los ganglios espinales, médula espinal y bulbo raquídeo; seguido de un proceso neurodegenerativo progresivo que afectaría al cerebelo, especialmente a los núcleos profundos. De entre estos, el más afectado es el núcleo dentado, donde se produce una atrofia de las neuronas glutamatérgicas y una degeneración de los terminales sinápticos corticonucleares que contienen ácido γ -aminobutírico (GABA; *γ -Aminobutyric Acid*) (Koeppen et al., 2015b). En fases muy avanzadas de la enfermedad, también se ven afectadas la vermis y los hemisferios de la corteza cerebelar (Koeppen and Mazurkiewicz, 2013). Los estudios de neuroimagen han demostrado que la atrofia progresiva de los pedúnculos cerebelosos superiores (que contienen los axones aferentes de los núcleos profundos cerebelosos) se correlaciona con el deterioro neurológico progresivo de los pacientes (Akhlaghi et al., 2011). Otros biomarcadores de neuroimagen en el cerebelo también se correlacionan con el déficit neurológico (Gramegna et al., 2017), lo cual sugiere que la progresiva neurodegeneración en el cerebelo podría ser el componente principal del avance del trastorno neurológico en la AF.

Otro de los órganos especialmente afectado es el corazón, donde está descrito una hipertrofia celular, fibrosis difusa y fibrosis miocárdica focal, así como infiltración inflamatoria, cicatrización y acumulación de hierro en el ventrículo izquierdo (Koeppen et al., 2015a).

1.2. Bases moleculares de la AF

La AF es una enfermedad causada por una deficiencia en el gen de la frataxina (FXN) que codifica para la proteína frataxina (FXN). El gen, de 80 kilobases (kb), está localizado en el brazo largo del cromosoma 9 (9q13-21.1) y formado por 7 exones (exones 1, 2, 3, 4, 5a, 5b y 6), a partir de los cuales se sintetiza un transcrito de aproximadamente 1,3 kb compuesto por 5 exones y que codifica para una proteína de 210 aminoácidos. La FXN es una proteína muy conservada en la escala filogenética, habiéndose descrito genes homólogos en numerosas especies y siendo los dominios más conservados los exones 4 y 5a (Koutnikova et al., 1997).

La mutación mayoritaria que presentan los pacientes de AF consiste en una expansión anormal del triplete guanina-adenina-adenina ((GAA) n). Esta expansión está localizada en el primer intrón del gen FXN y está relacionada directamente con un descenso de los niveles de frataxina. El número de repeticiones en individuos sanos es de entre 10 y 66 repeticiones, mientras que puede llegar a ser de hasta 1700 en el caso de pacientes de AF. Se sabe que la cascada de eventos moleculares que da lugar a la expansión tiene lugar cuando el número de repeticiones alcanza un

umbral aproximado de 35 repeticiones. Cuando la expansión presenta entre 35 y 66 repeticiones se considera que está en un estado "pre-mutacional" (Campuzano et al., 1996).

El aumento del número de repeticiones del triplete GAA produce una disminución de los niveles de mRNA de FXN, siendo en pacientes de AF de un 4-29% respecto de los valores normales, y de un 50% en portadores asintomáticos, lo cual está correlacionado con una disminución en los niveles de proteína frataxina (Sacca et al., 2011). Además, también se ha descrito que el número de repeticiones es directamente proporcional a la gravedad de la enfermedad e inversamente proporcional a la edad de inicio (Evans-Galea et al., 2012).

Más del 95% de los pacientes de AF son homocigóticos para esta expansión, mientras que el 5% restante presentan en uno de los alelos una expansión y en el otro una mutación puntual que va asociada con la pérdida de la función de la proteína. Se han identificado hasta 30 mutaciones puntuales diferentes (*missense*, *nosense* o de *splicing* alternativo) pero en ningún caso se han observado pacientes homocigotos para estas mutaciones (Li et al., 2013). Esto se debe muy probablemente a que la ausencia total de frataxina es letal en las primeras fases del desarrollo embrionario (Cossee et al., 2000).

Para explicar el descenso en los niveles de frataxina como consecuencia de la expansión se han propuesto varios mecanismos, los cuales serán desarrollados detalladamente más adelante.

1.3. Estructura y función de la frataxina

La frataxina es una proteína ubicua y es más abundante en aquellos tejidos con un alto requerimiento energético, como cerebro, medula espinal, corazón, hígado, páncreas y músculo esquelético (Campuzano et al., 1996). Están descritas varias formas de la proteína frataxina, siendo la mayoritaria una proteína de 210 aminoácidos localizada principalmente en la matriz mitocondrial y asociada a la membrana interna (Campuzano et al., 1997). Su estructura molecular está formada por un sándwich $\alpha\beta$ compacto con dos dominios muy conservados de unión a otras proteínas (Prischi et al., 2010). Esta forma mayoritaria de la frataxina es producida a partir del transcrito formado por los exones 1, 2, 3, 4 y 5a del gen (Campuzano et al., 1997).

Tras su síntesis en el citoplasma, la frataxina es dirigida a la mitocondria al poseer una señal de localización mitocondrial en la región N-terminal, donde es procesada proteolíticamente por la peptidasa de procesamiento mitocondrial (MPP, *Mitochondrial Processing Protease*), obteniéndose las distintas formas de la proteína (Cavadini et al., 2000) (Figura 1). Las formas obtenidas son la 42-210 (producto intermedio) y la 81-210, siendo esta última un subproducto de la anterior y estando considerada la forma madura de la proteína (Schmucker et al., 2008). Sin embargo, ambas formas permanecen de forma estable en la célula, poseyendo papeles

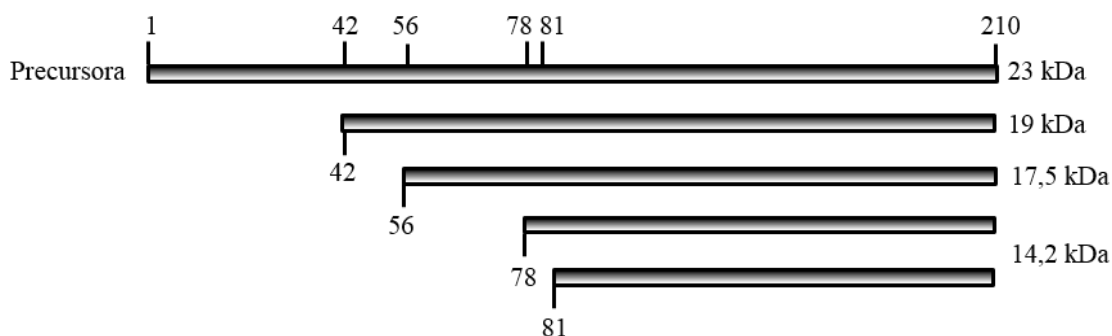


Figura 1: Procesamiento proteolítico de la frataxina I. Distintas formas de la proteína frataxina: 1-210 aa (proteína precursora; 23 kDa), 42-210 aa (19 kDa), 56-210 aa (17,5 kDa), 78-210 aa y 81-210 aa (ambas de 14,2 kDa).

complementarios en la biogénesis de los centros hierro-azufre (ISCs, *Iron Sulfur Clusters*) (Gakh et al., 2010). También están descritas otras formas intermedias: la 56-210, siendo la forma madura alternativa que se obtiene por un procesamiento alternativo al de la serina-81; y la forma intermedia 78-210, que parece ser un producto de degradación el cual se sintetiza para regular los niveles de frataxina en el interior celular (Schmucker et al., 2008) (Figura 1).

También existen otros transcritos menos abundantes que se generan por *splicing* alternativo en el intrón 4, o por contener el exón 5b en vez del 5a, en presencia o ausencia del exón 6, el cual no es codificante (Campuzano et al., 1996, Marmolino, 2011).

Recientemente se han descrito dos nuevas isoformas denominadas FXN II y FXN III, las cuales carecen de señal de localización mitocondrial ya que se generan por una variación en la transcripción del exón 1 de la FXN I. En el caso de la FXN II, esta se genera por un inicio de la transcripción diferente (exón 1b/ Δ 18). Esta isoforma se localiza en el citoplasma, ayuda a proteger los ISCs del daño oxidativo y es más abundante en el sistema nervioso (Xia et al., 2012). En cuanto a la FXN III, se obtiene por un *splicing* alternativo (exón 1a Δ 141) y se localiza en el núcleo celular. Está descrito que activa la biogénesis de los ISC mitocondriales y que es específica de corazón (Xia et al., 2012). Estas localizaciones particulares de las FXN II y FXN III quizás podrían ayudar a explicar la especificidad de tejido en la patología de la enfermedad, aunque son necesarios más estudios al respecto (Xia et al., 2012).

Se han descrito varias funciones posibles de la frataxina, siendo la función mejor caracterizada su papel en la biogénesis de los centros hierro-azufre (Muhlenhoff et al., 2002). Según esto, podemos describir una primera función (1) que consiste en el almacenamiento de hierro gracias a su capacidad de unir a este elemento (Adamec et al., 2000). Esto permite mantener al hierro biodisponible para diversos procesos celulares, controlar la homeostasis del hierro y los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS; *Reactive Oxygen Species*) (Gakh et al., 2010). Otra función (2) sería la interacción con otras proteínas para cederles hierro, como con la

ferroquelatasa, implicada en la formación de los grupos hemo (Bencze et al., 2007); y con la cisteína desulfurasa NFS1 o ISCU (*Iron-Sulfur Cluster Assembly enzyme*), implicadas en las formación de ISCs (Prischi et al., 2010). La tercera función (3), que surge como resultado de la combinación de las dos anteriores, consiste en la estabilización del complejo ISCU/NSF1/ISF11 y el control de la cesión de hierro al ISC en formación (Colin et al., 2013).

También (4) interviene en la reparación de los ISCs de la aconitasa mitocondrial, facilitando la entrada de Fe^{+2} a los centros hierro-azufre de esta proteína y evitando así su desensamblaje (Bulteau et al., 2004). Por otro lado, (5) favorece el transporte de electrones dentro de la cadena transportadora de electrones al interactuar con la succinato deshidrogenasa del complejo II (Gonzalez-Cabo et al., 2005).

Además, (6) está descrita su participación en la regulación de las defensas antioxidantes de la célula a través de PGC1 α (Marmolino et al., 2010) o Nrf2 (Shan et al., 2013). Por último, (7) recientemente también se ha propuesto que la frataxina podría estar involucrada en las roturas de cadena doble del DNA (Khonsari et al., 2016).

Se conocen pocos datos sobre la relevancia fisiológica de las isoformas minoritarias de la frataxina (FXN II y FXN III), aunque podrían participar en la biogénesis de los ISCs y su protección frente al estrés oxidativo (Xia et al., 2012).

A pesar de todo, continua estando poco clara la función exacta de la frataxina y como su deficiencia provoca la neurodegeneración observada en pacientes de AF. Sin embargo, si está clara la relación directa entre la disminución de los niveles de frataxina y la disminución de la síntesis de ISCs y el aumento de los niveles de hierro mitocondrial, lo que provoca la generación de radicales libres hidroxilo y otros ROS (Bayot et al., 2011).

1.4. Regulación del gen de la frataxina

El interés por desentrañar los mecanismos moleculares asociados a la AF ha llevado a avanzar en ciertos aspectos relacionados con los mecanismos de regulación del gen de la frataxina, aunque todavía hoy esta información es bastante incompleta. Actualmente hay descritos dos sitios de inicio de la transcripción (TSS; *Transcription Start Site*) en el gen FXN. El primero de ellos (TSS1) está situado a 221 pares de bases (pb) por delante (*upstream* de ahora en adelante) del sitio de inicio de la traducción ATG (Campuzano et al., 1996), y el segundo (TSS2) está localizado a 62 pb *upstream* del ATG, no estando claro todavía cuál de ellos es el dominante (Kumari et al., 2011).

La región promotora también presenta ciertas particularidades. La secuencia entre 1034 pb *upstream* y 100 pb por detrás (*downstream* a partir de ahora) del TSS1 desempeña el papel principal en la regulación del FXN, considerándose esta región como el promotor mínimo. Esta región carece de TATA-box pero contiene un elemento Inr (*mammalian Initiator*) 24 bp *downstream* del TSS1 y un elemento DPE (*Downstream Promoter Element*) situada 26 bp *downstream* del TSS. Estos elementos Inr / DPE están relacionados con el núcleo de la actividad promotora de un gen, aunque en el caso de la frataxina los estudios indican que no son necesarios para su expresión (Greene et al., 2005).

Aunque la frataxina es un gen esencial, su promotor no está muy conservado en mamíferos, debido principalmente a la inserción de retroelementos. Hasta hace algunos años, se pensaba que los elementos repetitivos de DNA eran "basura evolutiva". Sin embargo, son ya numerosos los estudios que sugieren que podrían desempeñar un papel importante en la regulación de genes cercanos. En el gen FXN se ha descrito la presencia en la zona del promotor de elementos SINE (*Short Interspersed Nuclear Element*) pertenecientes a las subfamilias MIR, AluJb y AluY (Figura 2). También está descrita una región a 132 bases *downstream* del TSS1 que comparte secuencia con un elemento L2, el cual es un tipo de LINE (*Long Interspersed Nuclear Element*). Las funciones exactas de estos elementos no están claras, pero si se ha observado que su supresión afecta significativamente la expresión de FXN (Greene et al., 2005).

En la región delimitada por el inicio del intrón 1 hasta el lugar donde se produce la expansión, se encuentran intercalados tres elementos repetitivos: un elemento MIRb, un elemento MER1 (*primate-specific MEdium Reiteration 1*), y parte de un elemento Alu, siendo este último a partir del cual deriva la expansión de repeticiones GAA (Greene et al., 2007) (Figura 2).

Respecto a los factores de transcripción que regulan la expresión de FXN, también son pocos los datos ofrecidos hasta el momento. Hay identificados sitios de unión para el factor de respuesta al suero (SRF, *Serum Response Factor*; 91-110 pb *downstream* del TSS1), importante en el desarrollo neuronal; un factor de transcripción AP2 (TFAP2; 139-154 pb *downstream* del TSS1), implicado en el desarrollo de la cresta neural; y un sitio de unión a un factor de respuesta temprana al crecimiento (EGR3, *Early Growth Response factor 3*; 233-249 pb *downstream* del TSS2). La supresión de estas secuencias reduce significativamente la transcripción del gen, aunque aún no se ha conseguido una prueba directa que confirme la unión de estos factores de transcripción (Li et al., 2010). Está descrita la existencia de una E-box (*Enhancer-box*) crucial para la expresión de FXN y a la cual se unen los factores de transcripción MyoD y c-myc (Greene et al., 2007). También se ha descrito la presencia de un factor de unión a CCCTC (CTCF) entre 154 y 173 pb *downstream* del TSS1 (De Biase et al., 2009), el cual es una proteína aislante de la cromatina que previene la propagación de la heterocromatina (Bushey et al., 2008). Por último, existe un elemento

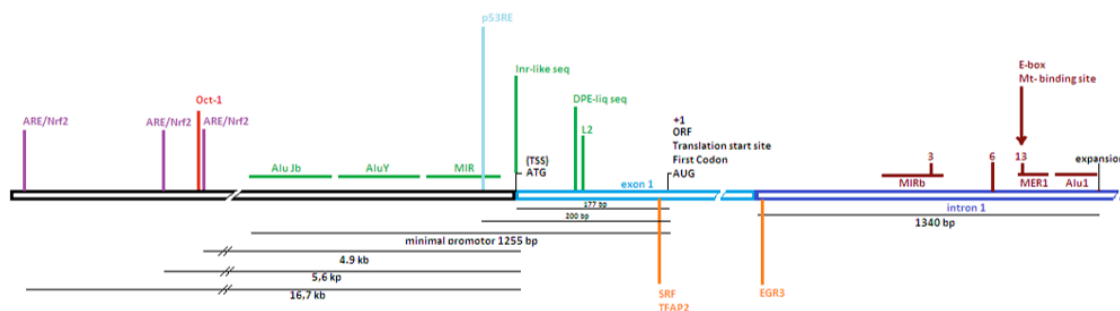


Figura 2: Regulación del gen de la frataxina. Secuencias repetitivas, señales reguladoras y factores de transcripción presentes en la región promotora y zona entorno al lugar donde se produce la expansión GAA en el intrón 1. Secuencias ARE (*Antioxidant Response Elements*), SINE (*Short Interspersed Nuclear Element*; incluye las secuencias AluJb, AluY, Alu1, MIR y MIRb), MER1 (*primate-specific MEdium Reiteration 1*), Inr (*mammalian Initiator*), DPE (*Downstream Promoter Element*), L2 (un tipo de LINE, *Long Interspersed Nuclear Element*), E-box (*Enhancer-box*), p53RE (*p53 Responsive Element*). Factores de transcripción Nrf2 (o NFE2L2, *Nuclear Factor (Erythroid-derived 2)-Like 2*), SRF (*Serum Response Factor*), TFAP2 (*Transcription Factor AP-2*) y EGR3 (*Early Growth Response factor 3*). Señales TSS 1 y TSS2 (*Transcription Start Site 1 y 2*) y ORF (*Open Reading Frame*).

p53RE (*p53 Responsive Element*) a 200 pb *upstream* del TSS1, indicando que la transcripción de FXN se activa bajo el control de p53 (Shimizu et al., 2014) (Figura 2).

Por otro lado, también se han descrito tres elementos de respuesta antioxidante (AREs; *Antioxidant Response Elements*) situados a 4,9; 5,6 y 16,7 kb *upstream* del TSS1. Estos elementos ARE dirigen la expresión de múltiples genes antioxidantes y anti-inflamatorios, y están relacionados con la presencia del factor de transcripción Nrf2 (también llamado NFE2L2, *Nuclear Factor (Erythroid-derived 2)-Like 2*) (Sahdeo et al., 2014) (Figura 2).

En cuanto a la expresión del gen FXN, este se expresa a un nivel relativamente bajo incluso en individuos sanos, siendo ligeramente mayor en los ganglios de la raíz dorsal y en la capa granular del cerebelo, así como en los tejidos con una alta tasa metabólica como el corazón o el hígado (Al-Mahdawi et al., 2006). Es importante destacar que la sobreexpresión de frataxina es tóxica para las células, lo que implicaría la existencia de un ajustado equilibrio en la regulación de su expresión (Navarro et al., 2011). La eliminación experimental del hierro provoca niveles reducidos de los transcritos de FXN tanto en células sanas como en las afectadas por AF. Esto podría sugerir un mecanismo de retroalimentación negativa entre el fenotipo de la enfermedad y la expresión de FXN en AF, pero la base molecular de este vínculo aún es desconocida (Li et al., 2008).

1.4.1. Cambios regulatorios causados por la expansión

Como hemos comentado anteriormente, cuando la expansión (GAA)_n posee entre 67 y 1700 repeticiones se produce una disminución de los niveles de mRNA de FXN, siendo en pacientes

de AF de un 4-29% respecto de los valores normales. Sin embargo, no se observan diferencias significativas en la vida media del mRNA (aproximadamente 11 horas) entre los pacientes de AF y los individuos sanos. Esto indica que los eventos desregulatorios que provocan niveles reducidos de FXN tienen lugar durante el proceso de transcripción y no a nivel post-transcripcional.

1.4.1.1 Bloqueo de la transcripción

La elongación de la transcripción puede verse bloqueada físicamente por diferentes mecanismos, en algunos de los cuales puede estar involucrada la expansión (GAA)_n. Está descrito que dicha expansión adopta conformaciones que dan lugar a estructuras triplex purina-purina-pirimidina, generando a su vez estructuras secundarias conocidas como “DNA pegajoso” que pueden impedir el avance de la RNAPII (Sakamoto et al., 2001) (Figura 3A). Igualmente, estas estructuras triplex también permiten la formación de híbridos estables RNA-DNA (*R-loops*) que podrían paralizar directamente el complejo RNAPII al final de la secuencia repetitiva (Kumari and Usdin, 2012), o bien indirectamente al ser reconocidas por la maquinaria de reparación del DNA (como los dímeros MSH2 / MSH3) (Ezzatizadeh et al., 2012) (Figura 3A). A pesar de las evidencias anteriores, no está claro si existe únicamente un problema en la elongación transcripcional (Krasilnikova et al., 2007), o si verdaderamente están afectados tanto el proceso de elongación como también el de iniciación (Kumari et al., 2011).

1.4.1.2 Silenciamiento epigenético

El segundo mecanismo propuesto para explicar la reducción de los niveles de frataxina a consecuencia de la expansión está basado en el fenómeno de la heterocromatización génica (Figura 3B). El 55% del genoma humano está compuesto por secuencias de DNA repetitivas, y se cree que la heterocromatina ha evolucionado como una respuesta protectora contra el ruido transcripcional que han podido generar estos elementos a lo largo de la evolución (Bashkurov, 2002).

En el caso concreto de la expansión de repeticiones (GAA)_n se ha visto que es capaz de silenciar genes cercanos (Saveliev et al., 2003), indicando la posibilidad de que se esté produciendo en la AF una heterocromatinización anormal que silencie el gen FXN (Figura 3B). A continuación se resumen los principales mecanismos epigenéticos propuestos para explicar el silenciamiento del gen de la frataxina en la ataxia de Friedreich.

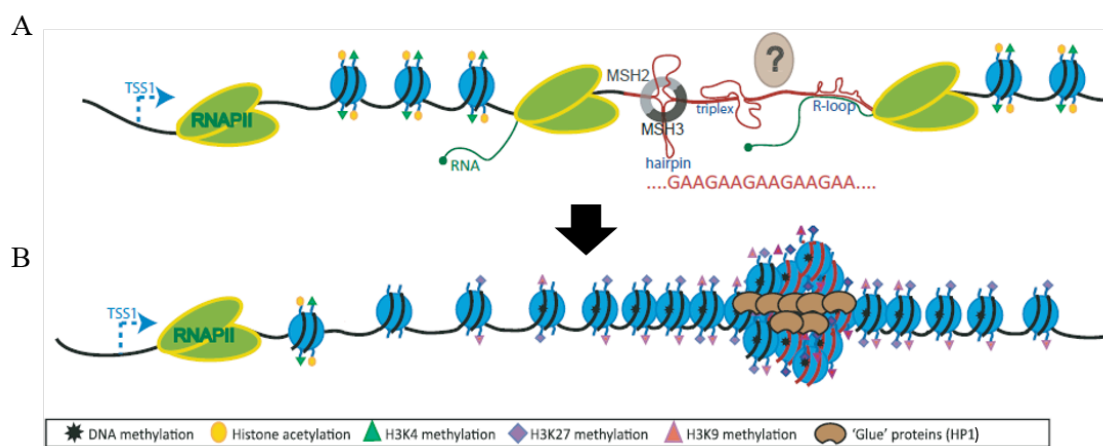


Figura 3: Modelo hipotético de la heterocromatinización del gen de la frataxina en la ataxia de Friedreich (adaptado de Yandim et al., 2013). **A.** Eventos tempranos que pueden dar lugar a la heterocromatinización de FXN. La expansión (GAA)_n (mostrada en rojo) es conocida por generar estructuras *triplex* e híbridos RNA-DNA conocidos como *R-loops*, las cuales pueden causar un bloqueo físico de la transcripción en curso. Además, tales estructuras son reconocidas por el mecanismo de reparación de la célula como los dímeros MSH2 / MSH3. **B.** Invasión de factores de la heterocromatina en el *locus* FXN. Aunque todavía no existen evidencias directas, se cree que estas conformaciones de DNA desencadenan el reclutamiento de factores heterocromáticos, como las histona-metiltransferasas (HMTs) que trimetila el residuo H3K27 y H3K9 (H3K27me3 y H3K9me3, respectivamente), siendo este último reconocido por la proteína de la heterocromatina HP1 y generando una estructura muy compacta de la cromatina (DNA pegajoso).

Metilación directa del DNA

Un mecanismo clave en la regulación de la expresión génica está basado en el hecho de que el DNA puede ser covalentemente modificado en los residuos 5'CpG3' (*Cytosine-phosphoguanine sites*) mediante la adición de grupos metilo (-CH₃). Esta metilación disminuye la probabilidad de unión de factores de transcripción (Li et al., 1992) y aumenta los niveles de heterocromatinización debido a la interacción de las metiltransferasas del DNA (DNMTs; *DNA Methyltransferases*) con la proteína de la heterocromatina HP1 (Lehnertz et al., 2003) (Figura 3B).

En el gen de la frataxina existen tres islas de citosina-fosfoguanina (CGIs; *Cytosine-phosphoguanine Islands*) las cuales pueden ser metiladas, situándose la primera de ellas en la región que va desde el promotor hasta el inicio del intrón 1 (Takai and Jones, 2002). En un estudio que utilizó muestras de autopsia de individuos con AF (Al-Mahdawi et al., 2008) y en otro que utilizó células mononucleares de sangre periférica de pacientes con AF (Evans-Galea et al., 2012), se obtuvieron niveles elevados de metilación en la zona CpG situada *upstream* de la expansión. En estos estudios también se observó la existencia de una correlación directa entre el silenciamiento de FXN, la gravedad de la enfermedad y el nivel de metilación del DNA. En concordancia con estos resultados, está descrita la existencia de tres residuos en las región *upstream* a la expansión que se encuentran metilados en los alelos de AF mientras que no lo están

en individuos sanos, pudiendo indicar la presencia de nucleosomas o de proteínas de unión a DNA en los individuos no afectados (Greene et al., 2007).

Modificación de las histonas

El nucleosoma es la subunidad fundamental de la cromatina y está conformado por DNA enrollado alrededor del tetrámero de histonas H3/H4 y dos pares de dímeros H2A/H2B. La histona H1 es la encargada de enlazar el DNA a los nucleosomas. Las histonas son proteínas muy básicas y están cargadas positivamente, lo que explica su fuerte afinidad con el DNA. Sin embargo, esta afinidad puede modularse dependiendo de las modificaciones bioquímicas que sufren las histonas, principalmente en la cola N-terminal de las histonas H3 y H4 (Luger et al., 1997).

De entre las muchas modificaciones descritas, las más prevalentes y mejor estudiadas son la acetilación y la metilación de residuos de lisina (K). Todas las histonas nucleares pueden ser acetiladas, modificación que se correlaciona con el estado de eucromatina o de transcripción activa. Esto se debe a que la adición de grupos acetilo ($\text{CH}_3\text{CO}-$) reduce la carga positiva y, por lo tanto, la afinidad hacia el DNA. Las enzimas encargadas de la modulación de la acetilación son las histona acetiltransferasas (HAT), que catalizan la reacción de acetilación, y las histona desacetilasas (HDAC), que la eliminan. La acetilación de los residuos H3K9 y H4K16 son las marcas más robustas y representativas de la eucromatina (Shogren-Knaak et al., 2006).

Los residuos de lisina no acetilados pueden sufrir otra modificación bioquímica, la metilación, la cual también puede realizarse sobre residuos de arginina (R). A diferencia de la acetilación, la adición de grupos metilo ($-\text{CH}_3$) no cambia la carga electrostática de las histonas, pero sí introduce cambios conformacionales debido a interacciones hidrofóbicas. El resultado de la metilación puede ser la activación de la transcripción o la heterocromatización, dependiendo de donde se sitúe el residuo metilado. La metilación de histonas es llevada a cabo por las histona metiltransferasas (HMTs) y revertida por las histona desmetilasas (HDMs) (Bannister and Kouzarides, 2011). Existen diferentes tipos de metilaciones, siendo las marcas más representativas de la heterocromatina la trimetilación del residuo H3K9 (H3K9m_3), la cual es reconocida por la HP1 y crea una estructura de cromatina muy compacta o “DNA pegajoso” (Lachner et al., 2001) (Figura 3B); y las formas mono- y di-metiladas H3K9me_1 y H3K9me_2 respectivamente, que se encuentran sobre todo en los promotores silenciados de genes que anteriormente fueron eucromáticos (Barski et al., 2007).

Otras marcas relacionadas con la heterocromatización son la H4K20me_1 (Balakrishnan and Milavetz, 2010) y las formas di- y tri-metiladas del H3K27, las cuales están asociadas a una heterocromatina facultativa (Barski et al., 2007).

En lo que atañe a la AF, las marcas de heterocromatina clásicas H3K9me2, H3K9me3 y H3K27me3 están enriquecidas especialmente en las regiones que flanquean la expansión (GAA)_n, mientras que las marcas de acetilación están reducidas (Figura 3B). Esto sugiere que se produce una expansión bidireccional de la heterocromatina partiendo de la (GAA)_n dentro del *locus* FXN (Chan et al., 2013).

Como se comentó anteriormente, está descrito un sitio de unión a CTCF a 154 pb *downstream* del TSS1. La forma en que CTCF ejerce la actividad aislante frente a la heterocromatización aún no está claramente definida, aunque se cree que pueda reclutar enzimas eucromáticas y al complejo RNAPII, o también que actúe como una barrera física contra la heterocromatina (Witcher and Emerson, 2009). De hecho, se ha observado que en fibroblastos de pacientes con AF el factor CTCF no está unido a su sitio de unión y que la zona también presenta niveles incrementados de H3K9me3, H3K27me3 y HP1 (De Biase et al., 2009).

Es importante destacar que aunque existe un consenso sobre la heterocromatinización de la región intrónica cerca de la expansión, no se tiene tan claro respecto de la región promotora de FXN (Yandim et al., 2013).

Otros mecanismos regulatorios

El proceso de transcripción no es únicamente específico para los genes que codifican proteínas. De hecho, se ha demostrado que la mayoría del transcriptoma humano está formado por RNA no codificante procedente de secuencias repetitivas, regiones intergénicas y secuencias antisentido, habiéndose propuesto varios modelos de cómo esta última puede regular la expresión génica (Faghihi and Wahlestedt, 2009).

Para el gen FXN, está descrito un transcrito antisentido denominado FAST1 (*FXN Antisense Transcript 1*), el cual se extiende desde el primer intrón hacia el promotor. FAST1 parece ser producido a niveles más altos en los fibroblastos obtenidos de pacientes AF en comparación con los niveles obtenidos en individuos sanos. Sin embargo, no está clara la relación existente entre FAST1 y la heterocromatinización patológica en AF (De Biase et al., 2009).

Además de los mecanismos descritos anteriormente, también se han propuesto otros que pueden afectar a la expresión de FXN, como pueden ser alteraciones en el *splicing* que afecte a la expresión de las distintas isoformas (Kumari & Usdin, 2012; Evans-Galea, 2014) o la desregulación de miRNAs (Mahishi, 2012).

2. TERAPIA GÉNICA

2.1. Aspectos generales de la terapia génica

La terapia génica se define como el conjunto de técnicas que permiten vehiculizar secuencias de DNA o RNA al interior de células diana, con el objetivo de modular la expresión de determinadas proteínas que se encuentran alteradas, revirtiendo así el trastorno biológico que ello produce. (Shillitoe, 2009).

El campo de la terapia génica ha realizado grandes avances en las últimas décadas (Collins and Thrasher, 2015). Durante los primeros años se vio obstaculizada por la falta de eficacia y por algunos eventos adversos graves (Hacein-Bey-Abina et al., 2008). Sin embargo, actualmente existen ensayos clínicos de eficacia y seguridad demostradas, e incluso ya es comercial en Europa el primer producto de terapia génica (Yla-Herttuala, 2012).

Los tipos de terapia génica pueden ser clasificados atendiendo al tipo de célula diana:

- Terapia génica de células germinales: se modifica la información genética de las células precursoras de los óvulos y los espermatozoides, por lo que es transmitible a la descendencia.
- Terapia génica en células somáticas: se modifican las células somáticas, no siendo posible la transmisión a la descendencia.

Del mismo modo, dependiendo de la estrategia seguida, se pueden clasificar en:

- Terapia génica *ex vivo*: las células a tratar son extraídas de un individuo y crecidas en cultivo, sometiéndose al proceso de transducción *in vitro*. Aquellas células que hayan sido correctamente transducidas se expanden en cultivo y son introducidas de nuevo en el individuo.
- Terapia génica *in vivo*: el material genético se introduce directamente en las células del organismo, sin necesidad de la extracción y manipulación de las células *in vitro*.

Otros aspectos importantes a tener en cuenta cuando se diseñan estrategias de terapia génica son el tejido diana al que va dirigida la terapia génica y el tipo de vector más adecuado para tal fin. Además, es importante también definir el formato en el que se va a incluir el gen que queremos expresar, es decir, que tipo de material genético va a ser utilizado. Los genes se encuentran organizados en *locus* genómicos, donde los genes están compuestos por secuencias codificantes y no codificantes, además de secuencias reguladoras que controlan cuándo, dónde y cómo ha de expresarse dicho gen. Toda esta estructura muchas veces ocupa varias decenas de kilobases, lo

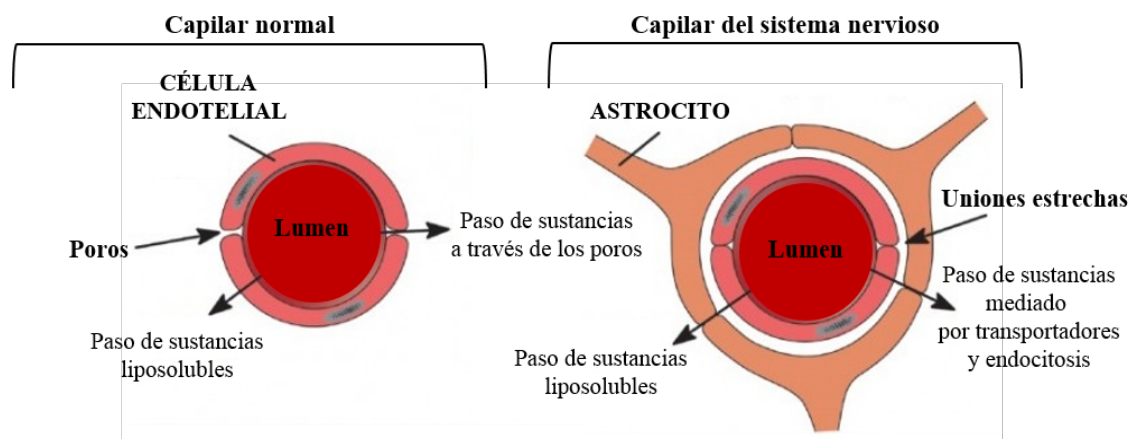


Figura 4. Representación esquemática de las diferencias entre el capilar normal y el presente en el sistema nervioso central. El capilar normal está formado por células endoteliales con presencia de poros y fenestraciones que permiten el paso de proteínas plasmáticas y pequeñas moléculas solubles en agua, así como la migración de leucocitos circulantes en la sangre. Sin embargo, en los capilares del sistema nervioso no hay presencia de poros al existir complejos de uniones estrechas (TJCs, *Tight Junction Complexes*) entre las células endoteliales, que junto con la presencia de astrocitos que rodean los capilares, generan una barrera de protección denominada “barrera hematoencefálica” (BHE).

que dificulta su inclusión en los vectores. Para subsanar este escollo, muchas veces se utilizan construcciones mínimas del transgén como el cDNA del gen de interés, el cual suele estar controlado por promotores heterólogos que en muchas ocasiones no consiguen una expresión óptima del gen. Por el contrario, utilizar el *locus* genómico completo del gen terapéutico permite una expresión fisiológica al llevar incluidos todos los elementos reguladores.

2.2. Terapia génica en las enfermedades neurodegenerativas

2.2.1. Barrera hematoencefálica

La aplicación de la terapia génica a las enfermedades neurodegenerativas presenta requisitos adicionales debido a las características particulares del sistema nervioso. La barrera hematoencefálica (BHE) representa un desafío importante para el tratamiento de enfermedades del SNC debido a su localización, estructura y función. La BHE es una barrera protectora del SNC formada por células endoteliales de la red capilar y por astrocitos, los cuales son esenciales para la creación de la barrera (Figura 4). Tanto la ausencia de fenestraciones vasculares como la presencia de complejos de uniones estrechas (TJCs, *Tight Junction Complexes*) entre las células endoteliales de los microvasos cerebrales (BMVECs, *Brain Microvascular Endothelial Cells*), crean una barrera física que restringe la difusión paracelular de proteínas plasmáticas y pequeñas moléculas solubles en agua, así como la migración de los leucocitos circulantes desde la sangre hacia el SNC (Persidsky et al., 2006). Así pues, la BHE funciona como una barrera selectiva que protege al cerebro de la entrada de sustancias nocivas permitiendo solo la entrada de nutrientes y moléculas específicos utilizando alguno de los siguientes mecanismos (Figura 5):

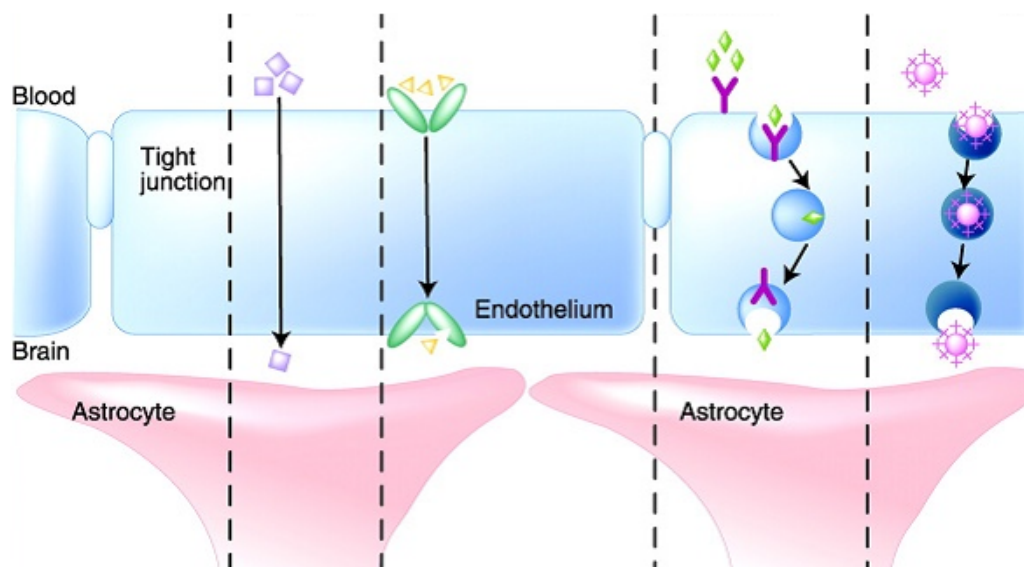


Figura 5. Mecanismos de paso a través de la barrera hematoencefálica (adaptado de Abbott et al, 2006). A. Difusión pasiva: las moléculas lipofílicas pueden atravesar directamente la barrera. B. Transportadores específicos de membrana. Algunas moléculas (glucosa, nucleósidos, aminoácidos, etc.) utilizan transportadores específicos presentes en la membrana. C. Transcitosis mediada por receptor. Algunas moléculas utilizan receptores presentes en la membrana (receptor de la transferrina, insulina, etc.) para ser transportados hacia la lámina basal a través de un endosoma. D. Endocitosis adsorptiva. Algunas sustancias, como la albúmina y otras proteínas plasmáticas, interactúan con la membrana plasmática apical y atraviesan la célula dentro de un endosoma.

- a) Difusión pasiva: existen moléculas lipofílicas (como las hormonas esteroideas) que pasan fácilmente a través de la membrana plasmática de las BMVECs y atraviesan la célula alcanzando su objetivo en el SNC (Salvador et al., 2014) (Figura 5A).
- b) Transportadores específicos de membrana: para poder captar nutrientes desde la sangre, las BMVECs expresan el transportador de glucosa-1 (GLUT-1). Algunas moléculas no deseadas pueden entrar directamente, por lo que existen transportadores impulsados por ATP como P-gp (*P-glycoprotein*; miembro de la superfamilia de proteínas ABC), que activamente transportan estos sustratos de vuelta a la luz del capilar sanguíneo (Miller, 2010) (Figura 5B).
- c) Transcitosis mediada por receptor: Las BMVECs expresan una serie de receptores de superficie celular que tienen el potencial de unirse a moléculas de la sangre. Una vez unidas, estas moléculas pueden ser dirigidas a través de la célula y ser liberadas en la lámina basal. Algunos de los receptores implicados en la transcitosis mediada por receptor son los de la insulina, la leptina, y la transferrina (Laakkonen et al., 2012) (Figura 5C).

- d) Endocitosis adsorptiva: algunas sustancias interactúan con la membrana plasmática apical y entran en la célula dentro de un endosoma. Este endosoma puede: (1) reciclarse, uniéndose de nuevo a la membrana plasmática apical y liberar su contenido a la sangre; (2) fusionarse con un lisosoma y degradar su contenido, (3) dirigirse a la membrana plasmática basal y liberar su contenido en el SNC; o (4) ser invaginados, formando cuerpos multivesiculares que posteriormente son liberados al espacio extracelular en forma de exosomas (Banks et al., 2004) (Figura 5D).

Sin embargo, y especialmente si las células diana son las neuronas, una vez que el vector ha atravesado el endotelio aún tendrá que superar diversos obstáculos que ofrece la BHE, como la lámina basal, los pericitos, los astrocitos y las ramificaciones microgliales (Persidsky et al., 2006). Se han desarrollado diversas técnicas como el uso de ultrasonidos para permeabilizar selectivamente la BHE y permitir la llegada del vector al parénquima (Thevenot et al., 2012). Sin embargo, debido a que la BHE es esencial para el mantenimiento de la homeostasis neuronal, cualquier terapia que afecte a su integridad puede tener efectos adversos (Obermeier et al., 2013).

2.2.2. Vías de administración

La elección de la zona en la que se administre un vector influirá en su capacidad para transferir su carga genética. Como hemos visto anteriormente, la BHE impone muchas restricciones, por lo

que unas de las vías de administración más comúnmente utilizadas es la inyección directa en la región cerebral diana, consiguiendo de esta manera eludir a la BHE. Aunque la inyección local tiene sus limitaciones, como por ejemplo una difusión limitada del vector, para ciertas enfermedades con patología localizada sigue siendo una opción viable, como es el caso de la enfermedad de Parkinson, en la que se ven afectadas principalmente las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (Bartus et al., 2014).

Otras vías de administración buscan conseguir una distribución más amplia, como por ejemplo la inyección intracerebroventricular (Meijer et al., 2009), intratecal (Samaranch et al., 2013), intranasal (Zhuang et al., 2011), o la administración sistémica por vía intravenosa (Foust et al., 2009). Esta última es muy prometedora, aunque es importante tener en cuenta una serie de limitaciones a parte de las que impone la BHE. Por un lado, el bazo y el hígado son potentes órganos de filtración de la sangre que pueden eliminar de la circulación el vector utilizado. Además, otros órganos no diana como el músculo o los pulmones también pueden ser transducidos, suponiendo un potencial riesgo tóxico (Peng et al., 2001). Por otro lado, otra de las limitaciones más importantes es la respuesta inmune innata y adaptativa. Las células inmunes innatas, como los macrófagos y las células endoteliales sinusoidales del hígado, pueden

internalizar y degradar los vectores administrados. También la preexistencia de anticuerpos contra el virus silvestre (del cual derivan los vectores virales) pueden neutralizarlo y eliminarlo de la circulación sanguínea. Por último, las células T citotóxicas dirigidas contra los antígenos virales o contra el producto del transgén pueden eliminar las células que hayan sido infectadas (Maguire et al., 2014).

Dado que los vectores administrados a través del torrente sanguíneo son más vulnerables a la eliminación por la acción de anticuerpos y células sanguíneas, se han desarrollado otras vías para la introducción del vector, como la inyección directa en el parénquima cerebral (Treleaven et al., 2012) o a través del líquido cefalorraquídeo (CSF, *Cerebrospinal Fluid*), en los que los vectores pueden lograr la transducción en presencia de anticuerpos ya que la concentración es mucho menor que en la sangre (Gray et al., 2013).

Una vez que el vehículo de administración ha alcanzado el SNC, este debe expresarse en las células apropiadas. Desde los inicios de la terapia génica, los vectores virales han sido los vehículos preferidos para internalizar DNA en las células debido a su capacidad innata de infectarlas. Además, varios vectores virales tienen tropismos naturales específicos para ciertos tipos celulares. Este tropismo dependerá de la capacidad de unión a receptores de superficie celular, el escape endosómico, el tráfico a través de las proteínas del citoesqueleto hacia el núcleo, y de la importación nuclear del genoma viral. A continuación, se detallan estas y otras características de los diferentes tipos de vectores utilizados en terapia génica del sistema nervioso.

2.3. Vectores usados en terapia génica

Uno de los principales retos a los que se enfrenta la terapia génica es encontrar el vehículo más apropiado para introducir el gen terapéutico en las células diana. Tradicionalmente se ha venido utilizando vectores basados en virus con su capacidad patógena minimizada o nula. Sin embargo, debido a los temores que existen por el uso de este tipo de vectores virales, recientemente se están desarrollando también otros sistemas no virales más seguros e inocuos.

2.3.1. Vectores virales

Los virus tienen la capacidad natural de introducir material genético en las células, lo que los hace un vector excelente para la terapia génica. Actualmente, los vectores derivados de lentivirus, virus del herpes simple, adenovirus y virus adeno-asociados son los vectores más comúnmente usados. Todos ellos presentan distintas ventajas e inconvenientes, por lo que la elección de un tipo de vector u otro va a depender en cierta medida de la célula diana a la que vaya destinada la terapia génica. Por ejemplo, si las células afectadas son neuronas, las cuales ya no se dividen, podría ser interesante el uso de vectores virales que no integren su material genético en el genoma

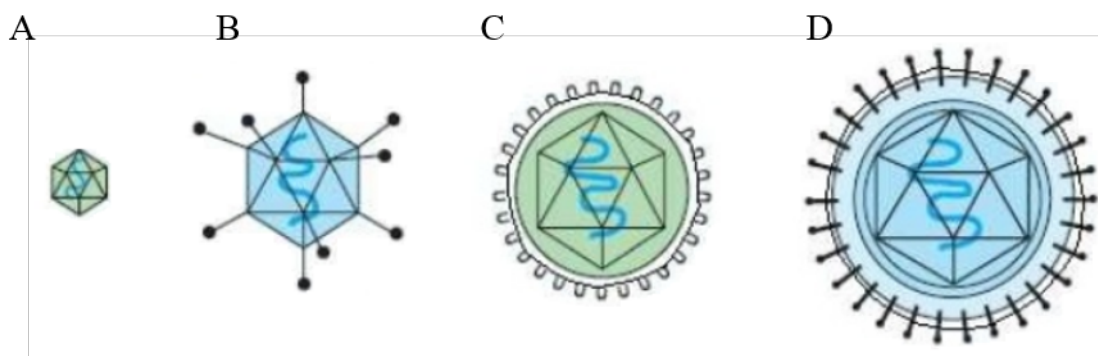


Figura 6. Representación esquemática de los vectores virales más utilizados en terapia génica. A. Virus adenoasociado (AVV). B. Adenovirus (Ad). C. Lentivirus (LV). D. Herpesvirus (HSV)

hospedador, dado que el gen terapéutico no se perderá y se evitarían problemas de mutagénesis insercional. En cambio, si las células diana se dividen, sería interesante el uso de vectores virales capaces de integrar el gen terapéutico en el genoma hospedador para que este no se perdiese en las sucesivas divisiones celulares. A continuación se desarrollan los distintos tipos de vectores virales utilizados en terapia génica.

- ***Vectores adenovirales***

Los adenovirus (Ad) son virus de doble cadena de DNA, con una capacidad de 36 kb y sin envuelta lipídica (Figura 6B). Tienen la capacidad de transducir tanto células en reposo como en división, y su material genético permanece en forma de episoma sin llegar a integrarse. Sin embargo, estos vectores tienen un alto riesgo de producir respuesta inmunitaria, sobre todo si hay necesidad de una readministración del vector. El serotipo más utilizado es el 2, aunque el uso de este vector es limitado debido a su alta toxicidad (Lim et al., 2010), utilizándose más comúnmente en tratamientos contra el cáncer (Yamamoto et al., 2017).

- ***Vectores adenoasociados***

Los vectores adenoasociados (AAVs; Figura 6A) son los más utilizados actualmente en terapia génica. Es un virus perteneciente a la familia de los *Parvovirus*, sin envuelta lipídica, con capacidad de empaquetamiento de 5 kb de DNA de cadena simple, y con posibilidad de infectar tanto a células en proliferación como en reposo. Los riesgos asociados a los AAVs son bajos debido a su naturaleza no patógena y su dependencia de una co-infección con un virus auxiliar (como el adenovirus) para poder replicarse y realizar una infección lítica. Las proteínas de la cápside facilitan su unión a los receptores de la superficie celular, los cuales pueden variar considerablemente entre los más de 100 serotipos que se han identificado (Gao et al., 2005). Las distintas cápsides proporcionan tropismos específicos, lo que permite modular el nivel de especificidad célula / órgano.

Algunas de las ventajas de los vectores AAV son: su capacidad de conferir expresión transgénica a largo plazo en células que no se dividen; su capacidad para administrar genes en forma de un episoma extra-cromosómico, con un riesgo bajo de mutagénesis insercional y oncogénesis; el alto tropismo neural de algunos serotipos, como por ejemplo el 2; y la capacidad del serotipo 9 de atravesar la BHE e infectar células endoteliales, astrocitos y neuronas (Foust et al., 2009, Saraiva et al., 2016).

- ***Vectores retrovirales***

Los vectores basados en retrovirus simples sólo pueden transducir células en división, por lo que aumentó el interés en desarrollar de vectores basados en lentivirus (LV; subtipo de retrovirus, Figura 6C), debido a su capacidad para transducir tanto células en división como quiescentes. Los vectores lentivirales mejor caracterizados se derivan del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) (Liu and Berkhout, 2014). Su material genético está constituido por RNA de cadena sencilla y utilizan la transcripción inversa para generar DNA. Esta molécula de DNA se inserta aleatoriamente en el genoma del huésped, aunque para las estrategias de terapia génica se han desarrollado vectores lentivirales no integradores (NILs, *Non-integrating Lentiviral vectors*) para evitar el riesgo de mutagénesis insercional (Shaw and Cornetta, 2014). Los lentivirus están envueltos por una bicapa de fosfolípidos que rodea una cápside con capacidad de almacenamiento de 10 kb (Escors and Breckpot, 2010).

Su capacidad de integrar el transgén en el genoma del hospedador es una ventaja interesante para infectar células en división, ya que así se garantiza la transmisión a la progenie. Por otra parte, en cuanto a la terapia génica en el SNC, resultan especialmente útiles debido a su gran tropismo por células neurales y por su capacidad para infectar células post-mitóticas. En este sentido, este tipo de vectores se han utilizado en ensayos clínicos para distintas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer o Párkinson (Lentz et al., 2012).

- ***Vectores herpesvirales***

El virus del herpes simple I (HSV-I; Figura 6D) es un miembro de la familia *Herpesviridae* con un genoma de DNA lineal de cadena doble que codifica alrededor de 80 genes (Roizman, 1996). Las glicoproteínas de la envuelta facilitan la entrada del virión en las células huésped (Shieh et al., 1992), y una vez dentro, el virus se desnuda y su genoma lineal se circulariza en el núcleo sin integrarse, formando un episoma. Es un vector interesante en terapia génica del SNC debido a su alta eficiencia de transducción, su gran capacidad de almacenamiento (152 kb), su capacidad para permanecer en un estado de latencia en neuronas y su alto tropismo neural a través del transporte axonal retrógrado (Berges et al., 2007, Jerusalinsky et al., 2012).

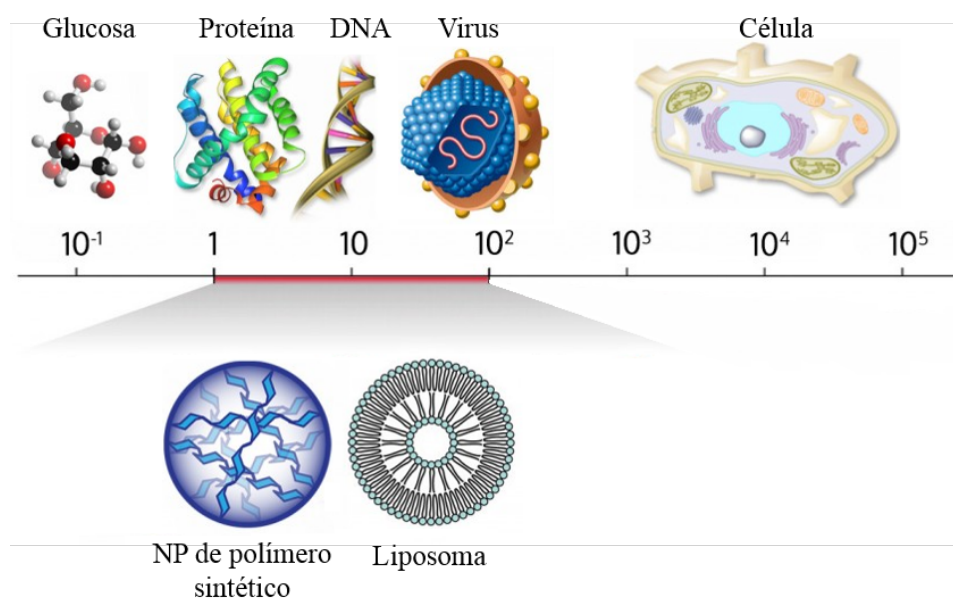


Figura 7: Escala de tamaño de las nanopartículas. Las nanopartículas poseen un rango de tamaño de entre 1 y 10^2 nm (arriba). Algunos ejemplos son las nanopartículas formadas con polímeros sintéticos o los liposomas (abajo).

Se han desarrollado dos tipos de vectores herpervirales: los recombinantes, que contienen parte del genoma de HSV; y los amplicones, que contienen únicamente una parte mínima del genoma original del HSV. Actualmente es posible generarlos sin la necesidad de utilizar un virus asistente, evitándose así posibles riesgos de respuesta inmune y patologías asociadas. A pesar de los avances de los últimos años en el diseño y producción de estos vectores, son pocos los ensayos clínicos que alcanzan la fase II (Lim et al., 2010). Un ejemplo de terapia génica usando vectores HSV-I es la realizada para tratar el glioblastoma multiforme (Lou, 2003).

2.3.2. Vectores no virales

Los sistemas no virales (NV) tienen varias ventajas sobre los vectores virales (Rogers and Rush, 2012), como la no preexistencia de inmunidad contra ellos y, debido a que no se derivan de patógenos, poseen un menor riesgo de seguridad al evitarse problemas relacionados con la replicación viral u oncogénesis. Sin embargo, los sistemas NV han sido mucho menos eficientes en la administración génica *in vivo* que sus homólogos virales.

Las estrategias de terapia génica basada en vectores no virales pueden ser clasificadas en dos: (1) métodos físicos, en los que el material genético se introduce en las células diana empleando distintas tecnologías como la electroporación, magnetoporación o sonoporación, entre otros (Ramamoorth and Narvekar, 2015) y (2) métodos químicos, en los cuáles el gen terapéutico es encapsulado en diferentes tipos de partículas que facilitan su entrada en las células diana y evitan

su degradación (Jayant et al., 2016). Este último método se desarrollará en mayor profundidad a continuación por ser una de las estrategias utilizadas durante el desarrollo de este trabajo.

2.3.2.1. Vectores NV basados en métodos químicos (nanopartículas)

El término “nanopartícula” (NP) es un concepto amplio y, como su propio nombre indica, engloba a todas aquellas partículas que se encuentran en la escala de tamaño nanométrico (Figura 7). Debido a esto, existe cierta controversia sobre que vectores se encuentran dentro de esta categoría y cuáles no, aunque por lo general se denomina NP a los vectores NV generados mediante métodos químicos. La mayoría de NPs pueden encapsular todo tipo de ácidos nucleicos, como DNA plasmídico, mRNA, siRNA y miRNA, lo que permite que se puedan desarrollar distintos tipos de terapias génicas (Riley and Vermerris, 2017). A continuación se clasifican los principales tipos de NPs desarrollados hasta el momento.

- ***NPs basadas en polímeros sintéticos***

Uno de los polímeros que ha demostrado gran potencial como sistema de administración es el PLGA (*Poly-lactide-co-glycolide Acid*) (Makadia and Siegel, 2011, Cai et al., 2016). Este polímero es uno de los sistemas biodegradables más conocidos al estar aprobado por la FDA (*US Food and Drug Administration*) y la EMA (*European Medicines Agency*) (Shive and Anderson, 1997). El PLGA es un polímero degradable que se comercializa con diferentes pesos moleculares y composiciones polimerales, lo que influye en que sea degradado en semanas o incluso años (Vert et al., 1994). A pesar de estas ventajas, también se han descrito diversos inconvenientes, como una baja eficiencia de encapsulación de las sustancias que transportan (normalmente del orden del 0,1-1% de la mezcla total), una masiva liberación a muy corto plazo, la posibilidad de agregación, y el alto coste que supone su generación y escalado (Danhier et al., 2012).

En este tipo de NPs, el DNA puede ser adsorbido a la superficie de la nanopartícula o encapsulado en el interior de la matriz polimérica mediante interacciones electroestáticas. Centrándonos en esta última estrategia, se puede aumentar la eficiencia de encapsulación del DNA (hidrofílico) en el PLGA (hidrofóbico) utilizando polímeros catiónicos que interaccionan con el DNA, como por ejemplo el PEI (Polietilenimina), el cual además favorece la internalización celular y el escape endosomal. (Sun and Zhang, 2010). Sin embargo, aunque de este modo la eficiencia de la encapsulación aumenta hasta un 80%, la cantidad de DNA encapsulado sigue siendo relativamente baja (0,1-1%).

Por otro lado, una gran ventaja que ofrece el PLGA es que puede ser funcionalizado mediante la adición de péptidos. Un ejemplo son los CPPs (*Cell Penetrating Peptides*) (Guidotti et al., 2017), como el péptido rico en argininas (r8), que favorecen la internalización celular del vector (Takeuchi and Futaki, 2016); o los *BBB-shuttles* (lanzaderas de la BHE), como por ejemplo el

péptido de unión al receptor de la transferrina (THR), que permiten el transporte a través de la BHE (Prades et al., 2015).

- **Otro tipo de NPs**

Las partículas sintéticas a base de lípidos tales como los liposomas se han utilizado durante años para la liberación génica en células cultivadas, y más recientemente también se han utilizado para la transferencia génica *in vivo* mediante inyecciones directas intracraneales (Rungta et al., 2013). Además, también se han logrado mejoras en las propiedades de liberación de los liposomas uniendo péptidos que permite atravesar la BHE (Demeule et al., 2008).

Otra opción es el uso de NPs magnéticas. La ventaja de estos vectores es que, tras un paso previo de permeabilización de la BHE mediante el uso de ultrasonidos, las NPs consiguen atravesar la BHE al colocar imanes entorno a la cabeza del ratón (Liu et al., 2012).

Un campo recién explorado es el uso de las vesículas extracelulares (EVs, *Extracellular Vesicles*). Las EVs abarcan muchos tipos de partículas de membrana que se desprenden de las células hacia el medio extracelular, incluyendo micropartículas, microvesículas, exosomas y cuerpos apoptóticos. Los EVs poseen un rango de entre 50 y 200 nm y son secretadas de forma natural transportando proteínas, RNA, miRNA, e incluso DNA a las células vecinas (van der Vos et al., 2011, Jiang et al., 2017). Se han realizado ensayos de EVs que transportan compuestos antiinflamatorios, obteniéndose mejoras tras ser inyectadas intranasalmente en ratones (Zhang et al., 2012).

2.4. Terapia génica en la AF

Dado que la AF es una enfermedad autosómica recesiva en la que está afectado un único gen, una de las opciones de terapia génica que más se ha estudiado es la de transferir a las células diana el gen FXN sin la mutación. Una primera aproximación fue la utilización tanto de vectores AAVs como LVs portadores del cDNA de FXN en fibroblastos de pacientes de AF (Fleming et al., 2005). En este estudio inicialmente se observó un rescate en el estrés oxidativo en aquellas células transducidas, aunque a medida que el cultivo se iba propagando se perdía la expresión de frataxina con ambos tipos de vectores, siendo una posible explicación que la sobreexpresión de FXN resultase tóxica para los fibroblastos.

Recientemente, un trabajo empleando vectores AVVs también ha demostrado que es posible revertir el fenotipo cardíaco *in vivo* en un modelo de ratón con deficiencia de frataxina, llegando incluso a recuperar su función ventricular tras la terapia génica (Perdomini et al., 2014).

La mayoría de las aproximaciones de terapia génica utilizan vectores virales con una capacidad limitada de almacenamiento de DNA exógeno, por lo que suelen recurrir a la expresión del cDNA del gen terapéutico bajo el control de un promotor heterólogo normalmente de origen viral, con el consiguiente problema de sobre-expresión y sus posibles efectos tóxicos.

Para intentar conseguir niveles más parecidos a los fisiológicos, nuestro laboratorio ha desarrollado diversos estudios de terapia génica para la AF utilizando vectores basados en el virus HSV-1. Se seleccionó este vector por su gran capacidad de almacenamiento, que permite transportar el *locus* completo del gen de la frataxina humana dentro de un cromosoma artificial de bacteria (BAC; *Bacterial Artificial Chromosome*). Con esta aproximación se observó una recuperación de los niveles de FXN y un rescate frente al estrés oxidativo en fibroblastos de pacientes de AF (Gomez-Sebastian et al., 2007a). Además, también se comprobó que el uso de este BAC permite la expresión a largo plazo de FXN *in vivo* (Gimenez-Cassina et al., 2011), y de revertir el déficit de coordinación motora causado por la ausencia de FXN al inyectar el vector herpesviral en la oliva inferior de ratones (Lim et al., 2007).

Por último, en nuestro laboratorio se ha utilizado también un vector herpesviral portador del gen del factor neurotrófico BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) en ratones en los que se había inducido una deficiencia de FXN en el cerebelo. Se observó un rescate de los marcadores apoptóticos y de la atrofia de las células de Purkinje, además de una mejora significativa en la coordinación motora (Katsu-Jimenez et al., 2016). Esta aproximación combinada del gen terapéutico junto con genes pro-supervivencia podría resultar muy interesante en los casos en los que la estrategia de administración no permitiera llegar a todas las células afectadas. Según esto, las células transducidas, además de ser “rescatadas” al contar con una copia correcta del gen, podrían ayudar a la recuperación de células vecinas no transducidas al expresar genes pro-supervivencia que codifican proteínas secretadas como el BDNF.

A parte de inyecciones directas, también se han realizado estudios mediante la inyección de vectores por vía intravenosa. Un ejemplo es la administración de vectores AVVs con el gen FXN, lo que permitió una reversión de la cardiomiopatía provocada por el déficit de FXN (Gerard et al., 2014). Sin embargo, este tipo de abordaje no resultaría efectivo para tratar la afección neurológica principal de los pacientes de AF, ya que acceder al SNC a través del sistema sanguíneo presenta ciertas limitaciones, como ya hemos comentado anteriormente.

Otra aproximación fue la utilización de nucleasas con dedos de zinc (ZFNs; *Zinc Finger Nucleases*) para escindir la expansión (GAA)_n en linfoblastos, fibroblastos e iPSCs (*induced Pluripotent Stem Cells*) provenientes de un paciente de AF. Esta estrategia aumentó los niveles de mRNA y FXN, y también los niveles de ATP y de la actividad aconitasa (Li et al., 2015).

Un protocolo óptimo en el tratamiento y cura de la AF también debe considerar una vía de administración del gen terapéutico lo menos invasiva posible. Según esto, y teniendo en cuenta que el SNC es el sistema más afectado en la AF, este trabajo explorará nuevas alternativas de terapia génica del SNC mediante el uso de vectores, tanto virales como no virales, modificadas para permitir su paso a través la BHE.

OBJETIVOS

Esta tesis tiene como objetivo principal la exploración de nuevas estrategias en la terapia génica de la ataxia de Friedreich mediante el uso de vectores HSV-1 y nanopartículas portadores del *locus* genómico de la frataxina. Para ello nos hemos marcado los siguientes objetivos:

1. Estudio de la localización de los posibles elementos reguladores presentes en el *locus* genómico de la frataxina.
2. Comprobar la expresión de las distintas isoformas del gen de la frataxina por un vector HSV-1 portador del *locus* genómico de dicho gen.
3. Mejora del proceso de generación y purificación de los vectores HSV-1.
4. Modificación química de los vectores HSV-1 para permitir su paso a través de la barrera hematoencefálica.
5. Generación de nanopartículas funcionalizadas portadoras del *locus* genómico de la frataxina.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

1.1. Cultivo de líneas celulares

Durante la realización de esta tesis se han utilizado las líneas celulares SH-SY5Y (neuroblastoma humano; *American Type Culture Collection* (ATCC): CRL-2266), G 16-9 (derivada de la línea de glioma Gli-36), N2A (neuroblastoma de ratón; CCL-131), VERO 2-2 (epitelio de riñón de mono; CCL-81) y VERO 2-2-Bcl2 (derivada de la línea celular VERO 2-2). Todas las líneas fueron crecidas en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) al 10% de suero FBS (*Fetal Bovine Serum*; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU) inactivado por calor, con L-glutamina (Merck, Darmstadt, Alemania) 2 mM y mezcla de antibióticos estreptomicina - penicilina a 100 µg/mL - 100U/mL, respectivamente. Las células se mantuvieron en un incubador humidificado a 37 °C y 5 % de CO₂.

La línea establemente transfectada G 16-9, que expresa la proteína VP16 del HSV-1 para aumentar la expresión del promotor pIE4/5-LacZ, se cultivó en presencia del antibiótico de selección higromicina-B (Merck) a 200 µg/mL.

La línea VERO 2-2, que posee el gen IE2 de HSV-1, fue crecida en presencia del antibiótico G-418 (Merck) a 500 µg/mL. La línea VERO 2-2-Bcl2, transfectada establemente con el gen anti-apoptótico Bcl2 (plásmido ofrecido por la Dra. Sanz-Castillo), también fue cultivada también en presencia del antibiótico de selección puromicina (InvivoGen, San Diego, California, EEUU) a 1 µg/mL, además de con G-418 a 500 µg/mL.

El medio utilizado para los ensayos de suplementación de la línea VERO 2-2-Bcl2 se formuló según un protocolo ya descrito previamente (Rodrigues et al., 2013): DMEM al 10 % FBS, L-glutamina 2 mM, y suplementado con antioxidantes 1X, poliaminas 1X, glutatión reducido 2 mM, nucleósidos 1X (todos de Merck) y mezcla de aminoácidos preparada en el laboratorio con la siguiente concentración final (en mM): serina (400), asparagina (400), arginina (100), metionina (100), fenilalanina (100), leucina (300), valina (300) e isoleucina (300).

1.2. Diferenciación de la línea celular SH-SY5Y

Para diferenciar las células de la línea derivada de neuroblastoma humano SH-SY5Y a células similares a neuronas humanas se utilizó un protocolo optimizado en el laboratorio (Gimenez-Cassina et al., 2006) que añade algunas modificaciones a protocolos ya descritos anteriormente (Encinas et al., 2000). Las células SH-SY5Y se sembraron a una densidad de 5×10^3 células/cm² en placas previamente recubiertas con Matrigel (BD Biosciences, Bedford, Massachusetts,

EEUU) diluido 1:50 en DMEM. Tras 24 horas, el medio se sustituyó por otro específico de DMEM al 5 % FBS, L-glutamina 2 mM, ácido retinoico 10 μ M (Merck) y mezcla de antibióticos estreptomicina - penicilina a 100 μ g/mL - 100 U/mL, respectivamente. En este medio se crecen durante 5 días, cambiándose por medio fresco cada 48 horas.

Pasado este primer periodo de diferenciación de 5 días, se cambia el medio por otro específico consistente en Neurobasal suplementado con B-27 (ambos de Thermo Fisher Scientific), cloruro de potasio (KCl; Merck) 20 mM, GlutaMaxI (Thermo Fisher Scientific) 2 mM, dbcAMP (*N*(6),2'-*O*-dibutyryladenosine 3':5' cyclic monophosphate; Merck) 2 mM, rhBDNF (*recombinant human Brain-Derived Neurotrophic Factor*; Alomone Labs, Jerusalén, Israel) 50 ng/mL y mezcla de antibióticos estreptomicina - penicilina a 100 μ g/mL - 100 U/mL, respectivamente. Las células se crecen en este medio durante otros 5 días sin recambio por medio fresco. Pasado este periodo de tiempo, las células están listas para ser utilizadas en los diversos ensayos experimentales. En todo este proceso las células se mantuvieron en un incubador humidificado a 37°C y un 5% de CO₂.

1.3. Cultivo primario de neuronas de la corteza cerebral de ratón

Para la realización de estos cultivos se extrajeron las cortezas cerebrales de embriones de ratón de 18 días (E18) de la cepa C57BL/6 siguiendo un protocolo ya descrito anteriormente (Bartlett and Banker, 1984). Las cortezas fueron diseccionadas en solución salina equilibrada de Hank (HBSS, *Hank's Balanced Salt Solution*) con Ca²⁺/Mg²⁺, lavadas 3 veces con HBSS sin Ca²⁺/Mg²⁺ (ambos de Thermo Fisher Scientific) y digeridas durante 15 minutos a 37 °C en una solución de HBSS sin Ca²⁺/Mg²⁺ con 2,5 mg/mL de tripsina (Merck) y 1 mg/mL de DNaseI bovina pancreática (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), siendo esta mezcla agitada cada 5 minutos. Pasado este tiempo, se realizaron de nuevo 3 lavados con HBSS sin Ca²⁺/Mg²⁺ y se disgregó por completo con una pipeta Pasteur de cristal estrechada al fuego. Posteriormente se añadió medio Neurobasal suplementado con B-27, GlutaMaxI 2 mM y mezcla de antibióticos estreptomicina - penicilina a 200 μ g/mL - 200 U/mL, respectivamente. Por último, las células fueron sembradas sobre placas previamente tratadas con poli-L-lisina (Merck) 1 mg/mL en tampón borato 0,1 M y pH 8,7. Las células se mantuvieron en un incubador humidificado a 37°C y un 5% de CO₂. Pasadas 72 horas, las células podían ser utilizadas para el pertinente ensayo experimental.

1.4. Cultivo de células troncales de la mucosa olfativa humana

Las células troncales de mucosa olfativa (OMSCs, *Olfactory Mucosal Stem Cells*) se obtuvieron de forma voluntaria tanto de individuos sanos como de pacientes de AF. Las biopsias fueron realizadas por un equipo médico bajo la dirección del Dr. José Luis Muñoz Blanco del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM), y se realizaron según el protocolo

descrito anteriormente (Lanza et al, 1993), el cual fue aprobado por el comité de ética del HGUGM (Oberdoerfer et al., 2012).

Las células se cultivaron en medio definido DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific) con GlutaMaxI 2 mM, albumax al 0.5% (P/V), HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; Merck) 5 mM, glucosa (Merck) al 0.6% (P/V), aminoácidos no esenciales (alalina 44 mM, asparagina 45 mM, aspartato 40 mM, glutamato 40 mM y prolina 30 mM), heparina (Merck) 2 µg/mL, suplemento N-2 (Thermo Fisher Scientific) 1X, hrFGF-2 (*human recombinant Fibroblast Growth Factor 2*; PeproTech, Rocky Hill, New Jersey, EEUU) 10 ng/mL, hrEGF (*human recombinant Epidermal Growth Factor*; PeproTech) 20 ng/mL, NGF (*Nerve Growth Factor*; Merck) 50 ng/mL, LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*; Merck) 10 ng/ml y mezcla de antibióticos estreptomicina - penicilina a 100 µg/ml y 100 U/mL, respectivamente. Las células se mantuvieron en un incubador humidificado a 37°C y un 5% de CO₂.

2. GENERACIÓN DE VECTORES HSV-1

2.1. Obtención de plásmidos y BACs

Para la amplificación de plásmidos y BACs (*Bacterial Artificial Chromosomes*) se seleccionaron colonias aisladas en placas de LB (caldo Luria-Bertani) – agar con el antibiótico de selección correspondiente, y se creció un inóculo de 4 mL en LB y antibiótico de selección durante 8 horas a 37°C en agitación. Pasado este periodo de tiempo, se diluyó el inóculo a 1/500 en 100 mL (en el caso de amplificación de plásmidos) o en 400 mL (en el caso de BACs) de LB con antibiótico de selección y se creció durante 18 horas a 37°C en agitación. Posteriormente, se realizó la extracción y purificación del plásmido o BAC mediante el uso del kit de extracción de QIAGEN (Hilden, Alemania). La concentración de DNA se determinó mediante un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Finalmente, se comprobó que la extracción había sido correcta mediante una digestión enzimática y posterior electroforesis en geles de agarosa al 1%. En el caso de los BACs, debido a su gran tamaño, se realizó una electroforesis de campo pulsado o PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*).

2.2. Producción de vectores HSV-1

El protocolo de generación de partículas HSV-1 está basado en el método libre de virus auxiliar ya descrito previamente (Saeki et al., 2001). Las células VERO 2-2 y VERO 2-2-Bcl2 fueron sembradas a una densidad de 10⁶ células/placa y, pasadas 24 horas, fueron sometidas a una triple

transfección con Lipofectamina Plus (Thermo Fisher Scientific). Los plásmidos transfectados fueron:

- El BAC fHSV Δ pac Δ ICP27 ICP0+. Este plásmido de gran tamaño contiene todo el genoma del HSV-1 a excepción de algunas secuencias como medida de seguridad para evitar que sea empaquetado en las partículas virales generadas. Según esto, la señal de empaquetamiento (*pac*) y el gen inmediatamente temprano IE2 que codifica para la proteína ICP27, esencial para replicación, han sido eliminadas. Además, como otra medida de seguridad, el gen ICP0 está duplicado, alcanzando el BAC un tamaño de 178 kb, lo que excede la capacidad máxima de empaquetamiento en la cápside del HSV-1 (150 kb).
- El plásmido pEBH-ICP27, que expresa el gen ICP27, con el cual se ha visto que aumenta el número de partículas virales generadas cuando se incluye en la mezcla de transfección.
- Por último, el amplicón de interés, que debe llevar la secuencia *pac* para poder ser empaquetado en los vectores HSV-1 y el origen de replicación del HSV-1 *oriS*.

Las cantidades optimizadas para una p60 fueron de 2 μ g del BAC fHSV Δ pac Δ ICP27 ICP0+, 0,2 μ g del plásmido pEBH-ICP27 y 1,8 μ g del amplicón que se desea empaquetar. La mezcla de plásmidos junto con los reactivos de Lipofectamina Plus se añadió sobre la siembra de VERO 2-2 o VERO 2-2-Bcl2, dejando actuar durante 4 horas. Tras varios días (dependiendo del ensayo), las partículas virales fueron recogidas mediante dos métodos distintos según las necesidades del experimento; o extrayendo mecánicamente las células de la placa y sometiendo a lisis mediante tres ciclos de congelación-descongelación (combinación de hielo seco con etanol y baño a 37 °C) seguidos de una sonicación; o recuperando únicamente el sobrenadante para así obtener una mayor pureza de la suspensión de virus obtenida.

Los amplicones utilizados durante el desarrollo de esta tesis han sido:

- pHSV-LacZ: plásmido de 8,1 kb que posee el gen de la β -galactosidasa y está dirigido por el promotor IE4/5 (Geller and Breakefield, 1988) (Figura 8A).
- FXN-DDK-Myc: plásmido de 5,5 kb que codifica para el cDNA de la frataxina, la cual se expresa unida a los marcadores *Myc* y *DDK* en su extrema C-terminal. Está controlado por el promotor CMV (RC204880, OriGene Technologies, Rockville, Maryland, EEUU) (Figura 8B).

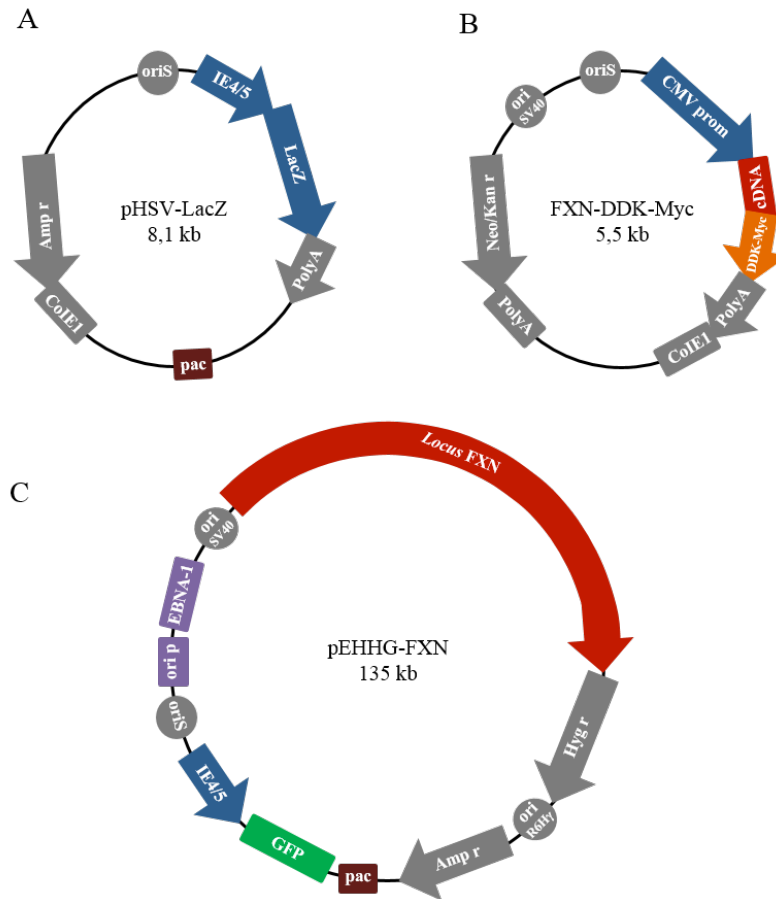


Figura 8. Mapas de los plásmidos empleados. A. El plásmido pHSV-LacZ contiene todas las secuencias requeridas para su empaquetamiento en vectores HSV-1 (señal de empaquetamiento *pac* y origen de replicación viral *oriS*), además del gen reportero LacZ y el gen de resistencia a ampicilina. B. El plásmido FXN-DDK-Myc contiene el cDNA de la frataxina, la cual se expresa unida en su C-terminal a los etiquetas DDK y Myc. También contiene los genes de resistencia a neomicina y kanamicina. C. El cromosoma artificial de bacteria pEHHG-FXN contiene el *locus* genómico de la frataxina y las secuencias requeridas para su empaquetamiento en vectores HSV-1 (*pac* y *oriS*). Como gen reportero lleva el gen de la proteína verde fluorescente (GFP; *Green Fluorescent Protein*). Además, contiene las secuencias del virus Epstein-Barr (*oriP* y *EBNA-1*; *Epstein-Barr Nuclear Antigen-1*), que le permiten mantenerse de forma extracromosómica en células en replicación. También contiene el gen de resistencia a higromicina.

- pEHHG-FXN: BAC de 135 kb con el *locus* genómico de la frataxina, además de las secuencias *oriP* y *EBNA-1*, lo que le permite mantenerse de forma autónoma y extracromosómica durante la replicación de las células. También expresa el gen reportero GFP (*Green Fluorescent Protein*) bajo el control del promotor IE4/5 (Gomez-Sebastian et al., 2007b). Durante este trabajo nos referiremos a él como BAC-FXN (Figura 8C).

2.3. Titulación de vectores HSV-1

Para la obtención del título se añadían distintas diluciones del sobrenadante vírico sobre siembras en monocapa de células G 16-9. Tras 48 horas, y cuando los vectores llevaban empaquetado el gen de la β -galactosidasa, el título se calculó mediante la tinción X-Gal Violeta

(técnica desarrollada más adelante) y se observó la tinción mediante un microscopio Axioskop2 (Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, New York, EEUU). Si el amplicón empaquetado expresaba la proteína GFP, la titulación se realizaba mediante la observación directa de la fluorescencia de la proteína en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioskop2.

2.4. Transducción de las células diana

Para descartar efectos inespecíficos, en todos los ensayos experimentales de transducción con vectores HSV-1 se realizaron controles de forma paralela, en los que únicamente se añadió a las siembras celulares la misma solución utilizada para resuspender los vectores HSV-1 pero sin ellos. La cantidad de partículas virales utilizada se determinó empleando multiplicidades de infección (MOI, *Multiplicity Of Infection*) crecientes entre 1 y 15, escogiéndose aquella MOI con la que se obtenía una transducción superior al 80% de las células diana.

3. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE MUESTRAS CELULARES Y TISULARES

3.4. *Western-blot*

El análisis de expresión proteica mediante electrotransferencia e inmunodetección (*Western-blot*) se realizó de la siguiente manera: las placas con la siembra celular fueron lavadas con tampón PBS (*Phosphate Buffered Saline solution*) y homogeneizadas mecánicamente a 4°C en un tampón de lisis compuesto por: HEPES 20 mM a pH 7,4; cloruro de sodio (NaCl; Merck) 100 mM; fluoruro sódico (NaF; Honeywell, Selzee, Alemania) 100 mM; ortovanadato sódico (Na₃VO₄; Merck) 1 mM; Triton X-100 (*t-Octylphenoxypoly-ethoxyethanol*; Merck) al 1%; EDTA (*Ethylenedinitrilotetraacetic Acid*, Merck) 5 mM; y cóctel de inhibidores de proteasas COMPLETE (Roche Diagnostics) 1X.

La concentración de proteínas se determinó a través de la técnica Bradford (Bio-Rad, Hercules, California, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez determinada la cantidad de muestra necesaria, se mezcló con tampón de carga con SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*), se hirvieron durante 5 minutos y las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles del 10-15% de acrilamida-bisacrilamida-SDS (Bio-Rad) (Laemmli, 1970). Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) y se bloquearon en una solución de PBS al 5% de FBS y al 0.2% Tween-20 (Merck). Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 1) diluido en

Antígeno	Anticuerpo	Tipo	Dilución	Fuente
Bcl2	Bcl2	mAb	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EEUU
Caspasa 3 activa	Caspasa 3	pAb	1:500	Cell Signaling Technology, Massachusetts, EEUU
Frataxina	Frataxina	pAb	1:1000	Protein Tools, Madrid, España. Actua contra el péptido TLGHPGSLDETTYERLAEETLC
GAPDH (Glyceraldehyde-3- Phosphate Dehydrogenase)	GAPDH	mAb	1:1000	Biogenesis, Poole, Reino Unido
Lámina B1	Lámina B1	pAb	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
Subunidad β del complejo V	Cox-V	pAb	1:1000	Molecular Probes, Eugene, Oregón, EEUU
β -tubulina	β -tubulina	mAb	1:5000	Merck

Tabla 1: Anticuerpos primarios utilizados en la técnica de *Western-blot*. Abreviaturas: mAb, Anticuerpo monoclonal generado en ratón; pAb, Anticuerpo policlonal generado en conejo. Todos los anticuerpos son del isótopo IgG. En caso de que algún anticuerpo en particular no se corresponda con lo anterior se indicará expresamente.

solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Pasado este periodo de tiempo, las membranas fueron lavadas tres veces con PBS e incubados con el anticuerpo secundario oportuno conjugado a un fluoróforo (dilución 1:5000; LI-COR, Lincoln, Nebraska, EEUU) durante 2 horas, a temperatura ambiente y en oscuridad. La inmunofluorescencia fue visualizada y analizada mediante el sistema Odyssey (LI-COR), corrigiendo las variaciones de cantidad de proteína total cargada mediante la normalización de la intensidad de las bandas con los valores obtenidos con un anticuerpo control.

3.5. Fraccionamiento celular

Las fracciones citosólica, mitocondrial y nuclear se obtuvieron mediante la utilización de un kit de fraccionamiento celular (Abcam, Cambrige, Reino Unido) siguiendo el protocolo ofrecido por la casa comercial. Resumidamente, las siembras de células fueron tripsinizadas y recogidas mediante centrifugación, se realizaron una serie de lavados y se obtuvieron las distintas fracciones subcelulares tras dos pasos sucesivos de extracciones mediante el uso de detergentes. La pureza de las fracciones se determinó mediante *Western-blot* utilizando anticuerpos contra β -tubulina (fracción citosólica), COX-V (mitocondrial) y lámina B1 (nuclear) (Tabla 1).

3.6. RT-PCR

El análisis de retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR; *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) se realizó para detectar la expresión de FXN en las células N2A, células troncales de la mucosa olfativa humana y muestras de cerebelo de ratón. El RNA fue extraído según el protocolo ofrecido por el propio Kit RNeasy Mini (QIAGEN), y se realizó también una digestión DNasa en columna (QIAGEN). La concentración de RNA se determinó mediante el uso del Nanodrop ND-1000 y su integridad fue comprobada mediante electroforesis en geles al 1% de agarosa.

La primera cadena del cDNA se sintetizó a partir de 3 µg de RNA usando la retrotranscriptasa Superscript III (Thermo Fisher Scientific) según el protocolo ofrecido por la casa comercial. Para cada muestra se comprobó la síntesis de cDNA con y sin presencia de la retrotranscriptasa para asegurar que no se producía amplificación del DNA genómico.

Las isoformas de FXN se amplificaron por PCR utilizando 1 µL de cDNA utilizando los cebadores descritos anteriormente (Xia et al., 2012), a excepción de la isoforma III, para la que se diseñó un cebador directo específico. Como controles internos se utilizaron cebadores para el GAPDH murino o la β -actina humana (Tabla 2).

Diana	Nombre del cebador	Secuencia	Tamaño del fragmento
FXN I	FXNI-d	5'-CCTTGCAGACACAAGCCATACA-3'	250 pb
	FXNI-i	5'-CCACTGGATGGAGAAGATAG-3'	
FXN II	FXNII-d	5'-TACGCGCGCTGGACTAGCTCA-3'	344 pb
	FXNII-i	5'-GGCTTGTCTGCAAGGTCTTC-3'	
FXN III	FXNIII-d	5'-GGCGCCGCGCAGTTCGAACC-3'	331 pb
	FXNIII-i	5'-CCACTGGATGGAGAAGATAG-3'	
GAPDH murina	GAPDH-d	5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3'	900 pb
	GAPDH-i	5'-CATGTGGGCCATGAGGTCCACCA-3'	
β -actina humana	β -actina-d	5'-CCACACTGTGCCCATCTACGAGGGGT-3'	479 pb
	β -actina-i	5'-AGGGCAGTGATCTCCTTCTGCATCCT-3'	

Tabla 2. Cebadores utilizados durante este trabajo. Abreviaturas: -d, directo; -i, indirecto; pb, pares de bases.

3.7. Viabilidad celular

Para los estudios de viabilidad celular se utilizó el ensayo de incorporación de calceína y yoduro de propidio (Mattson et al., 1995). Las células fueron tratadas durante 30 minutos a 37°C en oscuridad con calceína/acetoximetiléster (calceína AM; Molecular Probes) 1 µM y con yoduro

de propidio (Merck) 8 μ M. Tras la incubación, las células fueron visualizadas mediante un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioskop2.

La calceína AM es incorporada e hidrolizada por esterasas celulares únicamente en las células vivas, generándose una molécula con carga negativa que le imposibilita salir de la célula. Esta molécula emite fluorescencia de color verde. Sin embargo, el yoduro de propidio sólo es incorporado cuando la célula ha perdido la integridad física de la membrana plasmática, intercalándose en el material genético. Esta molécula emite fluorescencia de color rojo.

3.8. Tinción X-Gal Violeta

Esta técnica permite la tinción de color azulado de aquellas células que expresen el gen de la β -galactosidasa. En el caso de cultivos celulares, las placas fueron fijadas con paraformaldehído (PanReac Química, Barcelona, España) al 2 % en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente con paraformaldehído al 4 % en PBS durante otros 10 minutos. Pasado este tiempo, se realizan tres lavados con PBS. En el caso de los portaobjetos con cortes tisulares (ver Materiales y Métodos 4.3), al estar ya fijados, fueron directamente lavados tres veces con PBS.

La tinción se realizó mediante la adición de una mezcla de sales con el sustrato X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside; Apollo Scientific, Cheshire, Reino Unido) y su incubación en una estufa a 37°C durante el tiempo necesario (dependiendo del ensayo). Posteriormente, se realizaron otros tres lavados con PBS y se observó el resultado en un microscopio Zeiss Axioskop2.

3.9. Inmunofluorescencia

En el caso de muestras tisulares, las secciones fueron lavadas 3 veces en PBS e incubadas en solución de bloqueo en PBS al 5 % BSA y Triton X- 100 al 0,3 % durante 2 horas. Posteriormente, se incubó durante 12 horas a 4°C con el anticuerpo primario en solución de bloqueo en la dilución que correspondiese. Pasado este periodo de tiempo, las secciones se lavaron 3 veces con PBS e incubadas a temperatura ambiente durante 2 horas con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a Alexa-488 o Alexa-555 (ambos de Molecular Probes) diluido 1:1000 en solución de bloqueo. Tras nuevos lavados en PBS, las secciones fueron teñidas con DAPI (4'-6-diamidine-2-phenylindole; Merck) diluido 1:5000 en PBS durante 3 segundos para marcar los núcleos celulares. Por último, tras un último lavado, estos fueron montados con Fluoromount G (Southern Biotech, Birmingham, Alabama, EEUU).

Antígeno	Anticuerpo	Tipo	Dilución	Fuente
Calbindina D-28k	Calbindina D-28K	mAb	1:1000	Merck
GFP	GFP	pAb	1:200	Thermo Fisher Scientific
GFAP (<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>)	GFAP	mAb	1:400	Promega, Madison, Wisconsin, EEUU
Nestina	Nestina	mAb	1:200	Merck
β -galactosidasa	β -gal	pAb	1:200	MP Biomedicals, Eschwege, Alemania
β III-Tubulina	β III-Tubulina	mAb	1:200	Promega

Tabla 3: Anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunofluorescencia. Abreviaturas: mAb, Anticuerpo monoclonal generado en ratón; pAb, Anticuerpo policlonal generado en conejo. Todos los anticuerpos son del isótopo IgG. En caso de que algún anticuerpo en particular no se corresponda con lo anterior se indicará expresamente.

El protocolo para las muestras celulares es similar al descrito anteriormente, con la única variación de los tiempos de incubación de los anticuerpos primario y secundario (ambos 1 hora). Una vez montados los portaobjetos, estos fueron examinados en un microscopio de barrido láser confocal LSM710 acoplado a un microscopio vertical AxioImager.M2 (ambos de Carl Zeiss Microscopy)

4. TÉCNICAS CON ANIMALES

4.1. Animales de experimentación

Para el desarrollo de esta tesis se han empleado ratones de ambos sexos de la cepa C57BLACK6 (C57BL/6) de 8 semanas. En la realización de los distintos procedimientos experimentales se aplicó rigurosamente la normativa legal establecida y todos los procedimientos utilizados han sido aprobados por la comisión de Bioética de la Universidad Autónoma de Madrid. Los animales se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura (20 ± 2 °C), con ciclos alternativos de 12 horas de luz y oscuridad, y con comida y agua administradas *ab libitum*.

4.2. Inyección estereotáxica

Los ratones, previamente anestesiados con isoflurano y sin muestras de ningún reflejo, se colocaron en un estereotáxico (Stoelting, Wood Dale, Illinois, EEUU) equipado con una máscara de gas para ratón. Posteriormente se ajustó el estereotáxico en las siguientes coordenadas dependiendo de la zona a inyectar:

- Núcleos profundos del cerebelo: Bregma -6 mm, lateral 2,5 mm, profundidad 3 mm.
- Corteza cerebelar: Bregma -6 mm, lateral 2 mm, profundidad 1 mm.

Para las inyecciones se utilizó una aguja de calibre 26 con un bisel de 30 grados, unida a una jeringa de 10 μ l (Hamilton Robotics, Bonaduz, Suiza). A través del agujero de trepanación, se introdujo la aguja a la profundidad correspondiente, y se inyectó el volumen deseado a una velocidad de 1 μ L/min. Tras finalizar, se esperó 5 minutos y se retiró lentamente la aguja. Para terminar, se practicaron tantos puntos de sutura como fueran necesarios y los animales se colocaron en cubetas individuales para su recuperación, añadiendo analgésicos al agua del que disponen.

4.3. Extracción y procesamiento de órganos

Los ratones fueron sedados con tiobarbital (B. Braun VetCare, Rubí, Barcelona) y perfundidos con ACSF (*Artificial Cerebrospinal Fluid*) preparado según el protocolo descrito previamente (Notter et al., 2014). Los cerebelos fueron fijados post-extracción durante 24 horas en paraformaldehído al 4% en PBS 0,1 M, pH 7,4 a 4°C. Las muestras fueron crioprotegidas por inmersión en soluciones crecientes de sacarosa (Merck) al 10 y 20 % (durante 4 horas cada solución) y 30 % (12 horas). Mediante el uso de un criostato CM1850 (Leica Biosystems, Concord, Ontario, Canadá) y con los órganos embebidos en Tissue Tek (Sakura Finetek Europa, Alphen aan den Rijn, Holanda), se obtuvieron secciones coronales de 30 μ m de grosor, las cuales fueron colocadas en portaobjetos SuperFrost Plus (VWR, Radnor, Pensilvania, EEUU) y conservadas a -20°C.

5. TÉCNICAS DE ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Para el estudio epigenómico del gen de la frataxina y las regiones *upstream* y *downstream* en torno al gen, se seleccionó la región comprendida entre la posición 71629500 (donde termina el gen anterior a la frataxina, el gen PRKACG) y la posición 71736000 (donde empieza el siguiente gen, el TJP2) del cromosoma 9.

Los datos aportados por el consorcio ENCODE (*ENCyclopedia Of DNA Elements Project*, (ENCODE, 2004)) se han analizado a través del navegador ofrecido por la Universidad de California Santa Cruz (<https://genome-euro.ucsc.edu/>).

Las líneas celulares y tisulares aportadas por el consorcio Roadmap (Kundaje et al., 2015) han sido analizadas a través de la interfaz ofrecida por su propia página web (<http://epigenomegateway.wustl.edu/browser/roadmap/>).

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados mostrados en las distintas figuras de este trabajo fueron obtenidos al menos de tres experimentos independientes. La comparación estadística del conjunto de datos se realizó mediante la utilización de la prueba *t-Student*. Las diferencias se presentan con su significancia correspondiente o valor de p, que es la probabilidad de que una diferencia vista en una muestra ocurra de manera casual bajo la hipótesis nula. El grado de significancia se representó, en orden ascendente, de la siguiente manera: $p < 0,05$ (*), $p < 0,005$ (**) y $p < 0,001$ (***).

RESULTADOS

1. Estudio de los elementos reguladores en el *locus* genómico del gen FXN a partir de las bases de datos ENCODE y Roadmap

La mayoría de los estudios sobre la regulación del gen FXN realizados hasta el momento se han centrado en la región en torno al promotor mínimo (De Biase et al., 2009, Greene et al., 2005) y la región del intrón 1 en la que se produce la expansión (GAA)_n que causa la AF (Greene et al., 2007). Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que tanto las regiones intrónicas de un gen como las zonas intergénicas pueden desempeñar papeles importantes en la regulación genómica (Rivera and Ren, 2013). Un campo científico que ha adquirido especial relevancia en los últimos años es la epigenética, un mecanismo esencial en la regulación del genoma (Inbar-Feigenberg et al 2013). A continuación se exponen los resultados obtenidos del estudio epigenético realizado en el *locus* completo del gen FXN mediante la utilización de dos bases de datos: ENCODE y Roadmap.

1.1. Estudio en las líneas celulares ofrecidas por el consorcio ENCODE

El objetivo del consorcio ENCODE (*ENCyclopedia Of DNA Elements*) es identificar todos los elementos funcionales presentes en el genoma humano (ENCODE, 2004). Para ello, el consorcio ha reclutado e integrado una gran variedad de datos experimentales, siendo la interfaz desarrollada por la Universidad de California Santa Cruz la principal herramienta utilizada para acceder a estos datos (Sloan et al., 2016, Thomas et al., 2007).

Para poder analizar el estado en el que se encuentra la cromatina a través de los datos aportados por ENCODE, se han desarrollado diversos algoritmos como, por ejemplo, el ChromHMM (Ernst and Kellis, 2010, Ernst and Kellis, 2012) y el Segway (Hoffman et al., 2013). Ambos comparten muchas características y emplean modelos probabilísticos estrechamente relacionados (M.M. Hoffman & J. Ernst, 2012). Por ello, y dado que en el estudio del *locus* completo del gen FXN se obtuvieron resultados muy similares utilizando ambas herramientas, nos centramos en los resultados obtenidos mediante el algoritmo ChromHMM (Ernst et al., 2011) por ofrecer datos procedentes de un mayor número de líneas celulares. Sin embargo, entre las estudiadas por ambos algoritmos no existen líneas celulares de origen neural, lo que sería de gran interés para nosotros por estar especialmente afectadas en la AF.

Las líneas celulares utilizadas fueron las siguientes: GM12876 (células B linfoblastoides), H1-hESC (células madres embrionarias), K562 (células de leucemia eritocítica), HepG2 (células de

carcinoma hepatocelular), HUVEC (células endoteliales de la vena umbilical), HSMM (mioblastos del músculo esquelético, NHEK (queratinocitos normales del epidermo) y NHLF (fibroblastos pulmonares normales).

En el estudio se analizaron 9 marcas epigenéticas mediante la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina seguida de una secuenciación masiva del DNA (ChIP-Seq; *Chromatin Immunoprecipitation followed by high-throughput DNA Sequencing*) (Ernst et al., 2011) (Tabla 4).

Marca	Estado de la cromatina	Marca	Estado de la cromatina
H3K4me3	promotor	H3K4me1	<i>enhancer</i>
H3K4me2	promotor y <i>enhancer</i>	H3K9ac	<i>enhancer</i> fuerte
H3K36me3	región transcrita	H3K27ac	
H4K20me1		H3K27me3	región reprimida
		CTCF	región aislante

Tabla 4: Marcas epigenéticas analizadas y estado de la cromatina asociado.

Con el fin de analizar el *locus* completo del gen FXN, el cual incluye tanto la propia extensión del gen como sus zonas *upstream* y *downstream*, nos centraremos en una amplia región que abarca desde el final del gen inmediatamente anterior a FXN, el gen PRKACG, hasta el inicio del siguiente gen, el gen TJP2 (cromosoma 9, región 71629000-71736300) (Figura 9A).

Dado que lo que nos interesa es una visión general de las zonas reguladoras existentes en esta región genómica, se señalarán únicamente aquellas zonas en las que el patrón epigenético esté presente en más del 40% de las líneas celulares analizadas y su extensión sea superior a las 500 pb. Este análisis nos permite señalar nueve posibles regiones reguladoras dentro del *locus* genómico de FXN (Figura 9B): región *upstream* de FXN (regiones 1 y 2), promotor (3), intrones (4-8) y región *downstream* de FXN (9). Estas regiones y el estado de la cromatina asociado están recogidos en la Tabla 5. De entre todas ellas, destaca la parte final del intrón 4 y la zona *downstream* más cercana a FXN, por ser una zona en la que aparecen varias señales de regiones *enhancer* y *enhancer* fuerte (6-9).

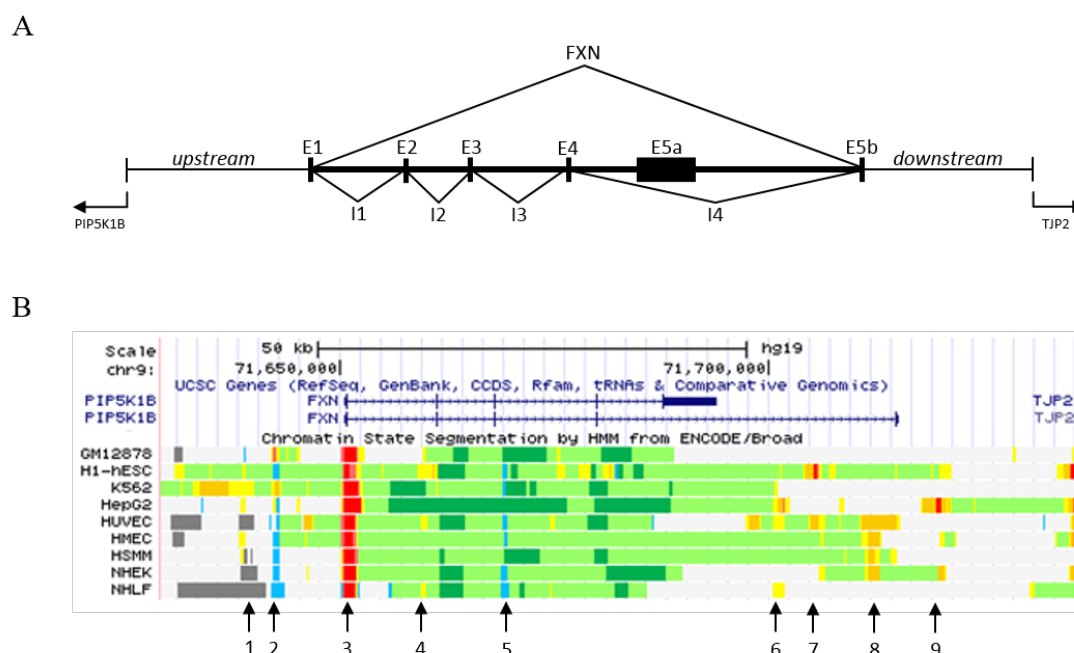


Figura 9: Estudio de los estados de la cromatina en el *locus* genómico de la frataxina a partir de los datos ofrecidos por ENCODE. **A.** *Locus* genómico de la frataxina. La región estudiada abarca desde el final del gen inmediatamente anterior a FXN (gen PRKACG) hasta el inicio del siguiente (gen TJP2), por lo que incluye toda la extensión del gen FXN y también sus zonas *upstream* y *downstream* (cromosoma 9, región 71629000-71736300). **B.** Estados de la cromatina según los datos aportados por ENCODE. Destacan nueve regiones dentro del *locus* genómico de FXN: región *upstream* (regiones 1 y 2), intrones (4-8), región *downstream* de FXN (9) y el promotor (3).

Región del cromosoma 9			Estado de la cromatina	
Nº	Inicio	Fin		
1	71638200	71639000	Enhancer	
2	71642200	71643000	Aislante	
3	71650400	71652100	Promotor	
4	71659400	71660200	Enhancer	
5	71668900	71669600	Aislante	
6	71700500	71702000	Enhancer	
7	71704200	71706600	Enhancer	
8	71710700	71713200	Enhancer fuerte	
9	71719600	71721400	Enhancer	

Tabla 5: Posibles regiones reguladoras en el *locus* genómico de la frataxina y estado de la cromatina asociado.

1.2 Estudio en los tejidos y cultivos primarios ofrecidos por el consorcio Roadmap

Los Institutos de Salud de los Estado Unidos (NIH, *National Institutes of Health of US*) fundaron el Programa Epigenómico “Roadmap” con el objetivo de dilucidar cómo los procesos epigenéticos contribuyen a la biología y las enfermedades humanas. Este consorcio proporciona mapas epigenéticos obtenidos en células madre y tejidos *ex vivo*, incluyendo varias estructuras cerebrales provenientes de humanos adultos (Kundaje et al., 2015).

Para la realización del estudio se han seleccionado diferentes tipos de tejidos, algunos de gran interés para el estudio de la AF. Esto incluye varios tejidos de cerebro, músculo, páncreas y corazón, los cuales se han clasificado en tres grupos para facilitar su análisis (Tabla 6). En este caso se han analizado cinco marcadores epigenéticos: H3K4me1, H3K4me3, H3K27me3, H3K27ac y H3K36me3. Todas estas marcas coinciden con algunas de las analizadas en el estudio anterior realizado con los datos de ENCODE, cuyos estados de la cromatina asociados están descritos en la Tabla 4.

Grupo	Tejidos	Grupo	Tejidos
Cerebrales	Giro angular	Otros	Ventrículo izquierdo del corazón
	Giro cingulado		Páncreas
	Caudado anterior		Gástrico
	Lóbulo temporal inferior		Intestino delgado
	Lóbulo frontal medio		Esófago
	Hipocampo medio		Mucosa del duodeno
	Sustancia negra		Mucosa del colon
Musculares	Músculo liso del recto		
	Músculo liso del estómago		
	Músculo liso del duodeno		
	Músculo liso del colon		

Tabla 6: Agrupación de tejidos realizada para facilitar el análisis de los datos ofrecidos por Roadmap.

1.2.1. Marcas epigenéticas sin variación entre muestras tisulares

Hay una serie de marcadores epigenéticos que muestran un patrón epigenético similar entre los diferentes tejidos comparados. Por ejemplo, podemos observar como el marcador H3K4me3, el cual esta asociado a zonas promotoras, coincide en todos los tejidos comparados (Figura 10A). Del mismo modo, la marca H3K36me3, asociada a genes con una transcripción activa, posee en

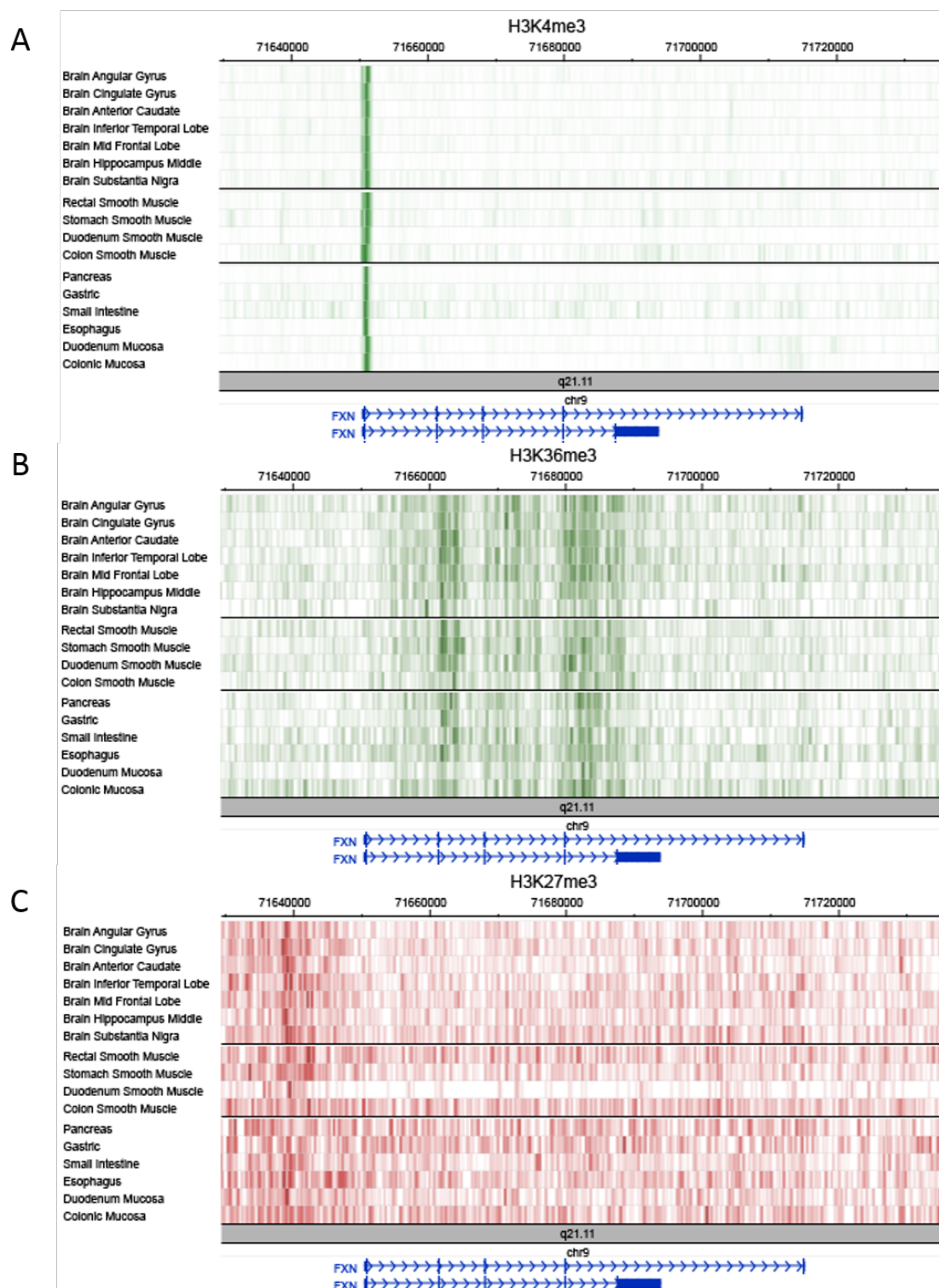


Figura 10. Marcas epigenéticas sin variación entre las muestras tisulares ofrecidas por Roadmap.
A. H3K3me3. La trimetilación de la lisina 3 de la histona 3 está relacionada con zonas promotoras, coincidiendo en todos los tejidos. **B.** H3K36me3. Esta marca epigenética está asociada a una transcripción activa, observándose un patrón similar en todos los tejidos. **C.** H3K27me3. Esta marca está asociada a zonas de heterocromatina, observándose una señal intensa en la región *upstream* del gen FXN similar en todos los tejidos.

todos los tejidos un patrón de señal similar, con la existencia de señales más intensas en el inicio del intrón 2, intrón 3 e inicio del intrón 4 (Figura 10B). Por último, la marca epigenética H3K27me3, asociada a zonas de heterocromatina, muestra una señal intensa en la región *upstream* del gen, también existiendo un patrón similar en todos los tejidos analizados (Figura 10C).

1.2.2. Marcas epigenéticas de zonas *enhancer*

Otro marcador analizado fue H3K4me1 (Figura 11A), el cual se relaciona con regiones *enhancer* (Tabla 4). En este caso, el estudio bioinformático del *locus* genómico de FXN muestra un mapa epigenómico más complejo, pero en el que se pueden observar también patrones comunes entre los distintos grupos de tejidos, al igual que ocurría con las marcas epigenéticas analizadas anteriormente. Sin embargo, con este marcador H3K4me1 también se aprecian patrones específicos de cada grupo de tejidos. Estas regiones y sus secuencias están recogidas en la Tabla 7, en la que también se ha asociado un rango de intensidad basado en los valores medios de señal aportados por Roadmap para facilitar su análisis. Teniendo en cuenta los valores máximo y mínimo de señal, estas fueron clasificadas en “débil” (señal menor de 7,5; color gris claro), “intermedia” (entre 7,5 y 10; gris medio) o “fuerte” (mayor de 10; gris fuerte) (Tabla 7).

En este análisis destaca la región conformada por la parte final del intrón 4 y la región *downstream* más cercana a FXN, en la que la señal de la marca H3K4me1 es muy escasa en los tejidos cerebrales y musculares, mientras que en el resto de los tejidos se observa una señal de mayor intensidad (Figura 11A).

H3K4me1							
		chr9		Tissues			
		Start	End	Brain	Muscle	Remainder	
Ups	1	71630400	71632000	12,14	13,50	9,67	
	2	71634700	71636000	5,71	3,75	10,17	
	3	71638300	71639600	8,43	5,50	10,50	
	4	71642100	71643100	13,29	9,25	12,17	
	5a	71650000	71650700	19,71	20,25	14,67	
O R F	I1	5b	71651000	71652200	20,14	17,25	16,17
		6	71659300	71660200	12,14	17,25	17,83
	I2	7	71661500	71662800	10,43	4,00	4,67
		8	71668400	71670400	12,29	11,50	8,67
	I3	9	71678600	71681700	9,71	8,00	9,33
		10	71683300	71686300	5,00	4,00	12,67
	I5	11	71690700	71691900	5,29	11,50	5,33
		12	71693000	71694500	16,71	15,50	12,67
		13	71697600	71698700	12,50	6,50	9,67
		14	71700300	71702400	11,86	8,50	15,50
		15	71703700	71705900	8,71	6,50	13,00
		16a	71708600	71709200	3,86	2,50	21,33
		16b	71712500	71715400	5,57	4,00	13,17
	Down	16c	71718800	71721000	4,71	4,00	14,00
		17	71726500	71727400	12,00	2,25	6,67

Tabla 7: Secuencias e intensidad de la señal de la marca epigenética H3K4me1. Código: señal “débil” (señal menor de 7,5; color gris claro), “intermedia” (entre 7,5 y 10; gris medio) o “fuerte” (mayor de 10; gris fuerte).

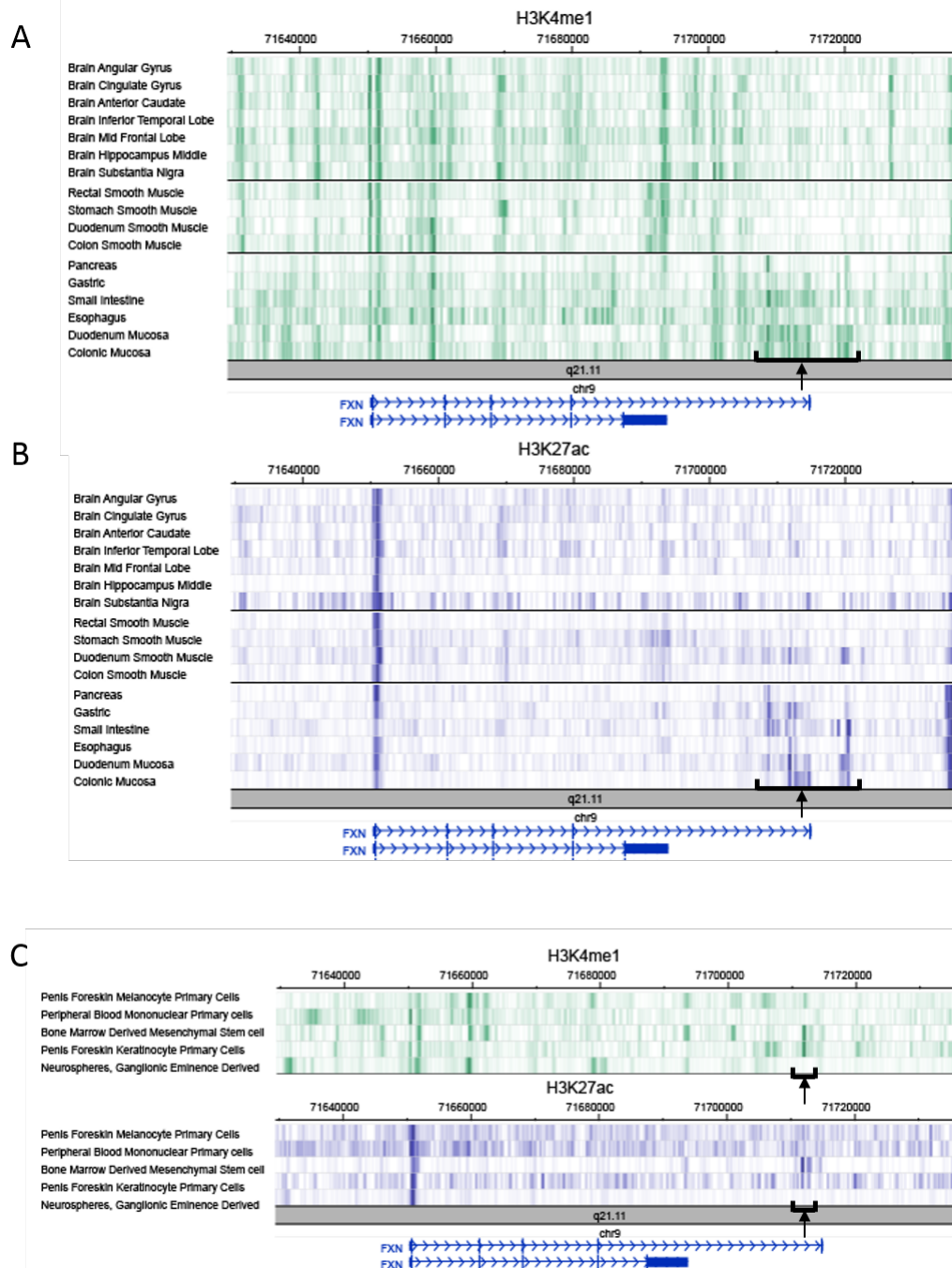


Figura 11. Marcas epigenéticas de zonas *enhancer* en los tejidos y células ofrecidos por Roadmap.

A. Marca epigenética H3K4me1 en muestras tisulares. Esta señal está relacionada con regiones *enhancer*, observándose patrones específicos de cada grupo de tejidos (cerebrales, musculares y otros tejidos). Destaca el patrón observado en la parte final del intrón 4 y la región *downstream* más cercana al gen de la frataxina, en la que la señal de la marca H3K4me1 es muy escasa en los tejidos cerebrales y musculares, mientras que en el resto de los tejidos la señal es de mayor intensidad. **B.** Marca epigenética H3K27ac en muestras tisulares. Esta modificación indica cuales de los *enhancers* señalados por H3K4me1 son “*enhancers* fuertes”. En este caso también destaca el marcaje intenso en la zona final del intrón 4 y la región *downstream* cercana a FXN, coincidiendo con las regiones *enhancer* destacadas de la marca H3K4me1. **C.** Marcas H3K4me1 y H3K27ac en cultivos primarios. Se observa la misma diferencia en el patrón de *enhancers* (H3K4me1) y *enhancers* fuertes (H3K27ac) en la región final del intrón 4, siendo una señal débil en el cultivo primario de origen neural (neuroesferas) y fuerte en el resto de cultivos primarios.

Sin embargo, dentro de este último grupo, los tejidos pancreático y cardíaco tampoco presentan esta señal intensa. Teniendo en cuenta que los tejidos cerebrales y musculares están especialmente afectados en la FA, y que los pacientes de esta enfermedad presentan atroñas cardíacas y desarrollan diabetes, estos resultados podrían sugerir una relación directa entre la inexistencia de secuencias *enhancer* en esta región y su predisposición a verse afectados en la AF.

Esta hipótesis se ve reforzada por el mapa epigenético que muestra la modificación H3K27ac (Figura 11B). Este marcador indica cuales de los *enhancers* señalados por H3K4me1 son “*enhancers* fuertes”. Del mismo modo, la zona del *locus* genómico de FXN en la que se observa un marcaje más intenso coincide con las regiones *enhancer* señaladas anteriormente (final del intrón 4 y región *downstream* cercana a FXN) en los mismos tipos tisulares (Figura 11B).

Por último, también se realizó el estudio de estas mismas marcas (H3K4me1 y H3K27ac) en los cultivos primarios ofrecidos por Roadmap: células mononucleares de sangre periférica, melanocitos y queratinocitos de prepucio de pene, células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea y neuroesferas derivadas de la eminencia gangliónica (Figura 11C). También en este caso, el análisis del *locus* genómico de FXN mostró la misma diferencia en el patrón de *enhancers* (H3K4me1) y *enhancers* fuertes (H3K27ac) en la región final del intrón 4: señal débil en el cultivo primario de origen neural (neuroesferas), y señal fuerte en el resto de cultivos primarios (Figura 11C).

2. Expresión de las isoformas de FXN por el vector BAC-FXN

Nuestro grupo ya demostró que los amplicones de HSV-1 que expresan *loci* genómicos completos proporcionan una expresión sostenida del transgén tanto *in vitro* como *in vivo* (Gimenez-Cassina *et al.*, 2011). En los ensayos que se exponen a continuación quisimos comprobar si el vector BAC-FXN, el cual posee el *locus* genómico completo de FXN, contenía todos los elementos reguladores necesarios para generar las diferentes isoformas de la frataxina que se han descrito recientemente (Xia *et al.*, 2012).

El *locus* genómico completo de FXN incluye los 80 kb del gen codificante de la frataxina, 38 kb de la zona *upstream* y 17 kb de la región *downstream*, por lo que está incluido toda la región mostrada en la Figura 9A. Para la generación de los vectores HSV-1 portadores del BAC-FXN se utilizó un sistema de empaquetamiento sin virus auxiliar, que consistió en una triple transfección en la línea celular empaquetadora VERO 2-2 (ver Materiales y Métodos).

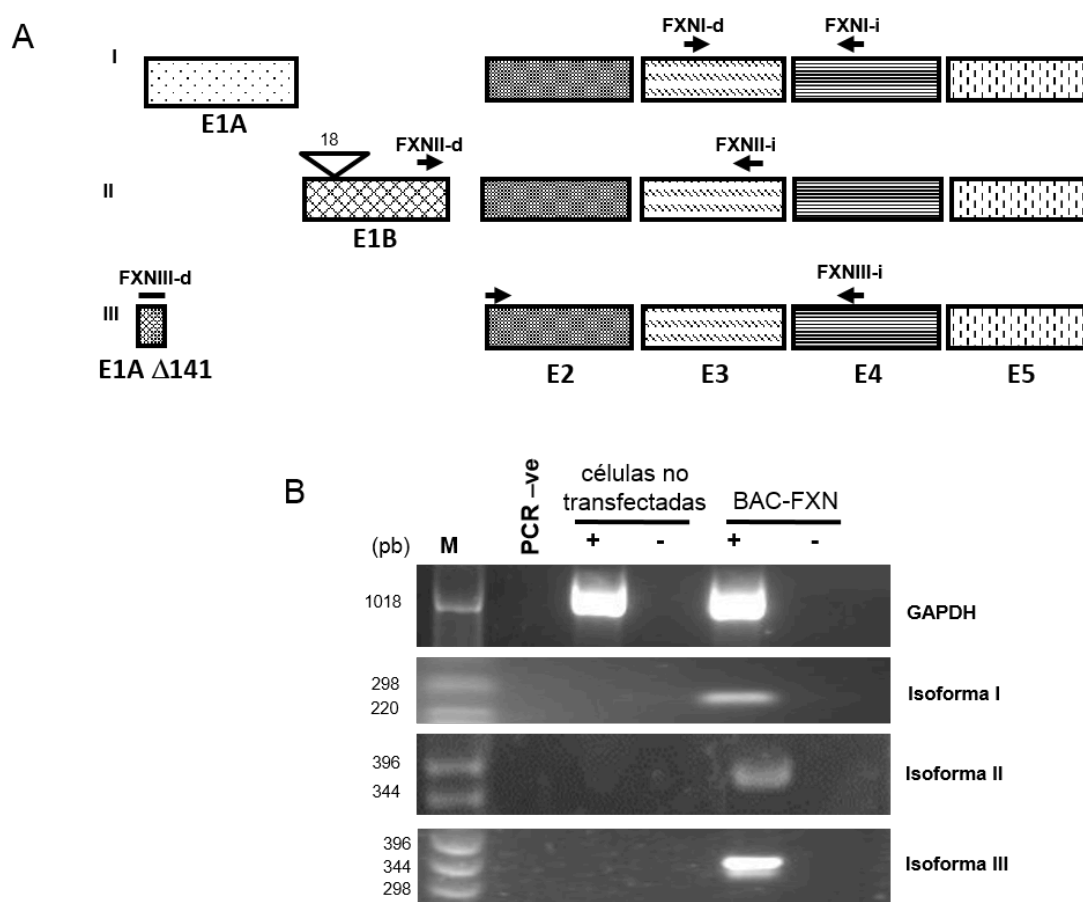


Figura 12. Transducción *in vitro* de la línea celular neuro-2A (N2A; células de neuroblastoma de ratón) mediante HSV-1 con el locus genómico de la frataxina (BAC-FXN) y posterior análisis de la expresión de las isoformas del gen de la frataxina. **A.** Representación esquemática de las distintas isoformas de la frataxina, mostrando la localización de los cebadores utilizados para su amplificación mediante RT-PCR. **B.** RT-PCR con los cebadores específicos para la frataxina humana. Se observa la expresión de todas las isoformas en células N2A transducidas con el BAC-FXN. M: marcador molecular; PCR-ve: control negativo para la reacción de PCR; (+): cDNA utilizado como molde para la PCR amplificado con la enzima RT; (-): cDNA utilizado como molde para PCR sin la enzima RT. Los números de la derecha indican el tamaño (en pares de bases, pb) de las bandas del marcador.

2.1. Expresión de las isoformas en células N2A de neuroblastoma de ratón

Un primer ensayo consistió en evaluar la expresión de las isoformas de FXN en la línea celular N2A de neuroblastoma de ratón. Las isoformas difieren principalmente en el primer exón, siendo idénticas del exón 2 al 5. Para la amplificación de todas ellas se utilizaron los cebadores descritos en el artículo original, a excepción de la isoforma III (ver Materiales y Métodos). La Figura 12A muestra una representación esquemática de las tres isoformas y la localización de los cebadores utilizados para su amplificación. Debido a que los cebadores diseñados son específicos para la frataxina humana, no se observó amplificación de las isoformas endógenas de ratón en las células N2A.

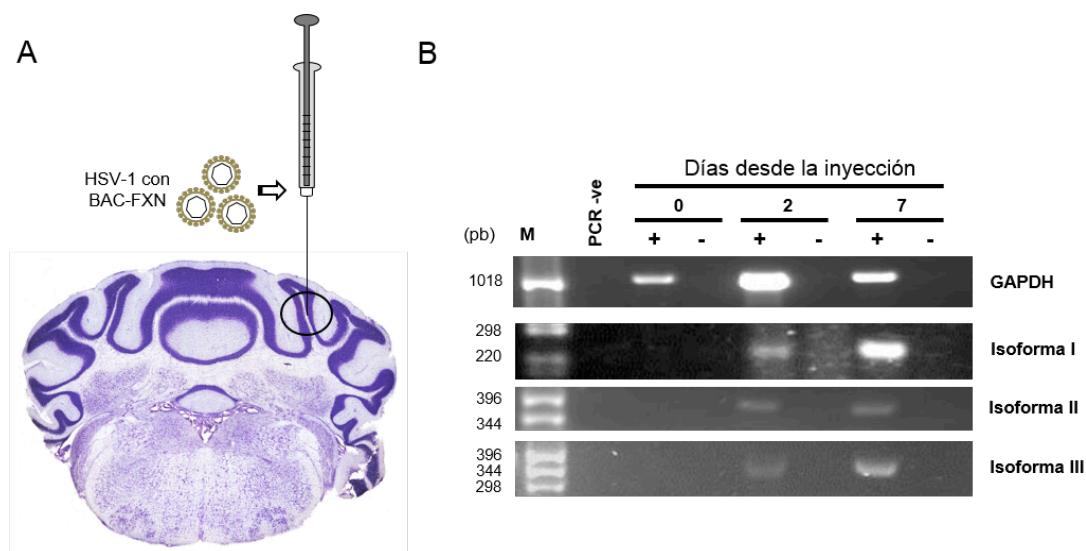


Figura 13. Inyección *in vivo* de vectores HSV-1 con el locus genómico de la frataxina (BAC-FXN) en la corteza cerebelar de ratón. A. Esquema de la zona de la corteza cerebelar en la que se inyectaron los vectores HSV-1 con el BAC-FXN en ratones adultos. B. Detección mediante RT-PCR de las distintas isoformas de la frataxina en diferentes tiempos desde el día de la inyección. M: marcador molecular; PCR-ve: control negativo para la reacción de PCR; (+): cDNA utilizado como molde para la PCR amplificado con la enzima RT; (-): cDNA utilizado como molde para PCR sin la enzima RT. Los números de la derecha indican el tamaño (en pares de bases, pb) de las bandas del marcador.

Para realizar este ensayo, las células fueron transducidas con los vectores HSV-1 BAC-FXN y tras 48 horas se realizó una RT-PCR para detectar las distintas isoformas de la frataxina. Como se muestra en la Figura 12B, las tres isoformas se amplificaron en las células N2A tras la transducción con el locus genómico completo de FXN, demostrando que es posible la expresión de todas ellas mediante la utilización de un vector herpesviral portador del locus completo de FXN.

2.2. Expresión de las isoformas *in vivo* en cerebelo de ratón

A continuación, se trató de verificar si el BAC-FXN también era capaz de generar todas las isoformas de la frataxina *in vivo*. Para este propósito, se realizó una inyección estereotáxica de los vectores HSV-1 portadores del BAC-FXN en la corteza cerebelar de ratones adultos C57BL/6 (Figura 13A). Dado que la expresión de frataxina alcanza sus niveles más altos entre 24 y 48 horas después de la inyección (Gimenez-Cassina et al., 2011), los ratones fueron sacrificados a los 2 y 7 días desde la intervención quirúrgica, utilizándose como control un ratón sacrificado justo después de la inyección. De igual modo, la expresión de las tres isoformas se detectó mediante RT-PCR, observándose la expresión de todas ellas tanto a los 2 como a los 7 días de la inyección (Figura 13B). La expresión de las isoformas I y III fue cualitativamente mayor a día 7 que a día 2, evidenciando una mayor expresión a lo largo del tiempo, aunque en el caso de la isoforma II el aumento no fue tan claro.

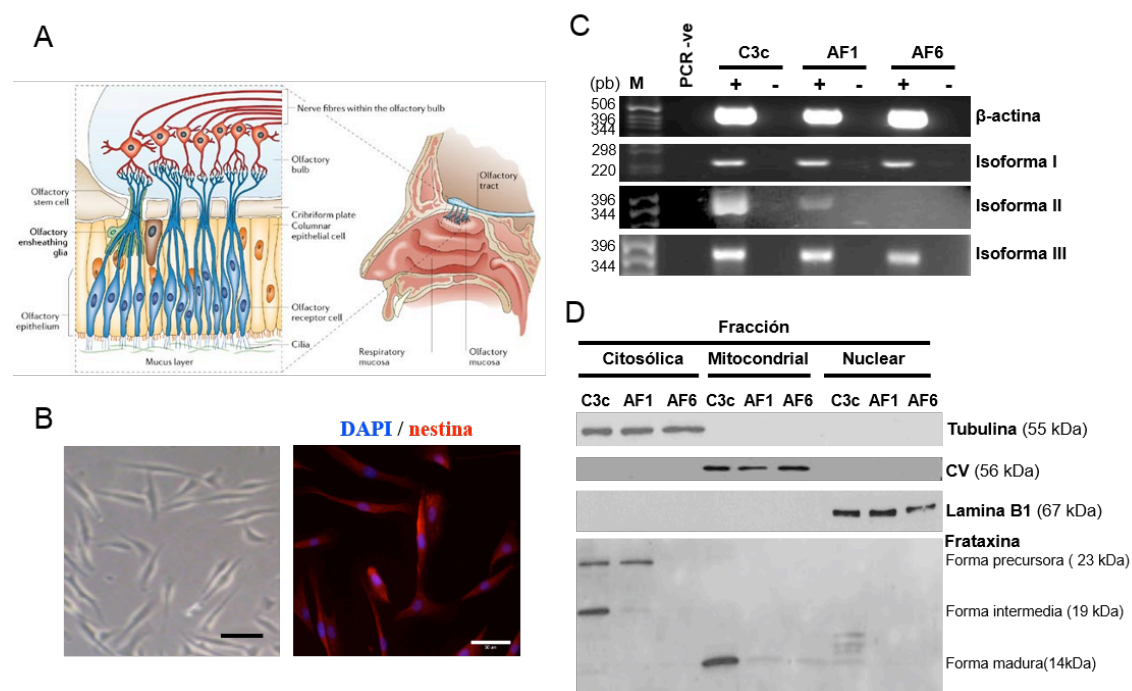


Figura 14. Transducción *in vitro* en células troncales de la mucosa olfativa (OMSCs, *Olfactory Mucosal Stem Cells*) con vectores HSV-1 con el BAC-FXN. A. Esquema del sistema nervioso olfatorio de donde se obtuvieron las OMSCs mediante biopsias en sujetos sanos y en pacientes de AF (Thuret et al, 2006). **B.** OMSCs en cultivo. Fotografía tomada con un microscopio de campo claro (izquierda) y tinción de inmunofluorescencia contra nestina (proteína de filamento intermedio tipo VI que se expresa principalmente en las células nerviosas; rojo) y DAPI (marcador de núcleos celulares; azul). Escala 20µm **C.** Presencia de las distintas isoformas de la frataxina en cultivos de OMSCs de pacientes de AF y de sujetos sanos. La RT-PCR demostró la expresión de las tres isoformas de la frataxina en este tipo de cultivo celular. M: marcador molecular; PCR-ve: control negativo para la reacción de PCR; (+): cDNA utilizado como molde para la PCR amplificado con la enzima RT; (-): cDNA utilizado como molde para PCR sin la enzima RT. Los números de la derecha indican el tamaño (en pares de bases, pb) de las bandas del marcador. **D.** Distribución subcelular de las distintas isoformas de la frataxina. Tras ser cultivadas las OMSCs y realizarles un fraccionamiento celular, se analizó mediante *Western-blot* la localización subcelular de las diferentes isoformas.

2.3. Expresión de las isoformas en células troncales de la mucosa olfativa humana

Nuestro laboratorio puso a punto un protocolo para el cultivo de células troncales de la mucosa olfativa humana (OMSCs, *Olfactory Mucosal Stem Cells*; Figura 14A y B), tanto de pacientes de AF como de donantes sanos (Oberdoerfer et al., 2012). Para poder utilizar estas OMSCs como modelo celular de la AF en los ensayos de transducción con vectores HSV-1 BAC-FXN, fue necesario realizar con anterioridad un análisis de la expresión de las tres isoformas tanto en las células provenientes de pacientes de AF (AF1 y AF6) como de individuos sanos (C3c). Se observó que la expresión de las tres isoformas en AF1 Y AF6 presenta unos niveles bajos tanto de mRNA como de la propia proteína FXN en comparación con las C3c. Concretamente, el análisis del

mRNA reveló una notable disminución en la expresión de las isoformas II y III en las células AF1 y AF6, siendo la isoforma II casi indetectable en las células AF6 (Figura 14C).

Como está descrito que cada una de las isoforma está localizada en un compartimento subcelular distinto, se realizó un fraccionamiento celular para obtener las fracciones citosólica, mitocondrial y nuclear aisladas (Figura 14D). Se observó la presencia de todas las isoformas en los diferentes compartimentos en las células C3c, mientras que en AF1 y AF6 apenas se observó señal en ninguno de ellos. Realizando una clasificación según los distintos compartimentos subcelulares, se obtuvieron los siguientes resultados:

- A nivel mitocondrial, la frataxina predominantemente fue la forma madura (la cual derivada de la isoforma FXN I), observándose niveles mucho mayores en las células C3c que en las AF1 y AF6.
- En el citosol se observaron niveles mucho más bajos de la proteína precursora derivada de FXN I en células AF6 que en C3c o AF1. También se detectaron niveles bajos de la frataxina madura (la cual se supone que derivaba del mRNA de la FXN II) en las células control, siendo difícilmente detectable en células de paciente.
- La frataxina nuclear (que presumiblemente proviene del mRNA de la FXN III) consta de varias bandas de mayor masa molecular que la correspondiente a la frataxina mitocondrial madura. Probablemente, este bandeo esté reflejando la presencia de productos de degradación surgidos del proceso de auto-escisión mediada por hierro (Xia et al., 2012). De nuevo la frataxina nuclear fue difícilmente detectable en las células AF1 y AF6.

Una vez caracterizada la expresión de las isoformas de FXN en las OMSCs, estas fueron transducidas con vectores HSV-1 BAC-FXN, con la finalidad de comprobar si el BAC era capaz de recuperar los niveles de frataxina en células de paciente de AF. 48 horas después de la transducción, se analizó la expresión de mRNA y de proteína FXN, utilizando células no transducidas como control. Se observó un aumento de la expresión de mRNA de todas las isoformas de frataxina en las células AF1 y AF6 en comparación con las células control no transducidas (Figura 15A). Respecto a la localización subcelular de las isoformas, los análisis de *Western-blot* mostraron un aumento neto de todas las isoformas en las fracciones citosólica, mitocondrial y nuclear (Figura 15B).

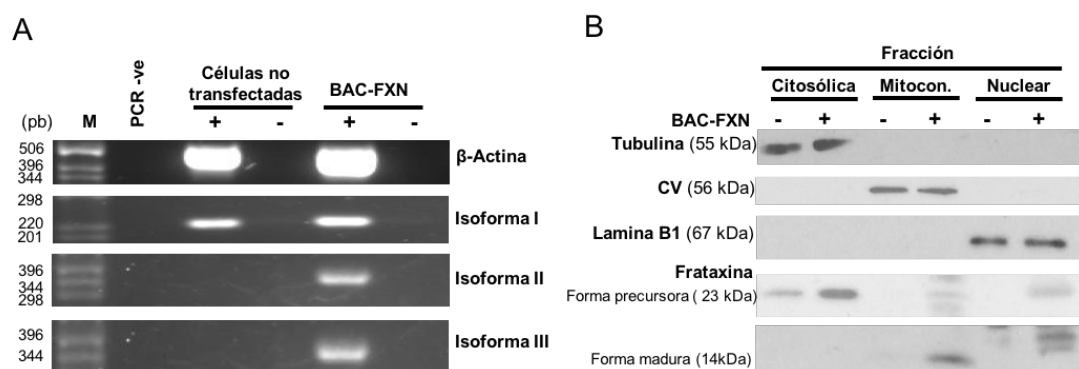


Figura 15. Recuperación de la expresión de las isoformas de la frataxina en cultivos de OMSCs de pacientes de AF tras la transducción de HSV-1 con el BAC-FXN. Los cultivos de OMSCs de pacientes de AF y de sujetos sanos fueron transducidos con vectores HSV-1 con el BAC-FXN, y tras 48 h se realizó la extracción del RNA o fraccionamiento celular. **A.** Expresión de las diferentes isoformas de la frataxina. Los extractos de RNA fueron analizados mediante RT-PCR, observándose la presencia de las distintas isoformas en las OMSCs de pacientes de AF transducidas. M: marcador molecular; PCR-ve: control negativo para la reacción de PCR; (+): cDNA utilizado como molde para la PCR amplificado con la enzima RT; (-): cDNA utilizado como molde para PCR sin la enzima RT. Los números de la derecha indican el tamaño (en pares de bases, pb) de las bandas del marcador. **B.** Localización subcelular de las distintas isoformas de la frataxina. El análisis de *Western-blot* de los extractos proteicos mostró la localización subcelular de las tres isoformas de la frataxina. Carriles 1, 3 y 5: células no transformadas, carriles 2, 4 y 6: células transducidas con HSV-1 con el BAC-FXN.

Según todos los resultados descritos anteriormente, se demuestra que el vector BAC-FXN contiene todos los elementos reguladores necesarios para la correcta expresión génica de FXN, incluyendo el correcto *splicing* alternativo (para generar la FXN III) y funcionalidad del promotor (para obtener la FXN II). Estos resultados han sido publicados recientemente por nuestro laboratorio (Perez-Luz et al., 2015).

3. Mejora del proceso de generación y purificación de vectores HSV-1

Durante el proceso de generación de vectores virales se produce una gran muerte celular por apoptosis, debido al estrés que causa la transfección de los DNA exógenos necesarios y, sobre todo, al efecto citotóxico de la replicación de los HSV-1 (Bednarek et al., 2002). Por otro lado, la generación de partículas HSV-1 que contengan almacenado un BAC es un proceso menos eficiente que el empaquetamiento de plásmidos pequeños. Por estos motivos, y junto con el hecho de que el uso de cualquier elemento en la clínica requiere de unos elevados niveles de pureza, hace imprescindible optimizar el proceso de empaquetamiento de vectores HSV-1 para obtener el mayor rendimiento y pureza posibles.

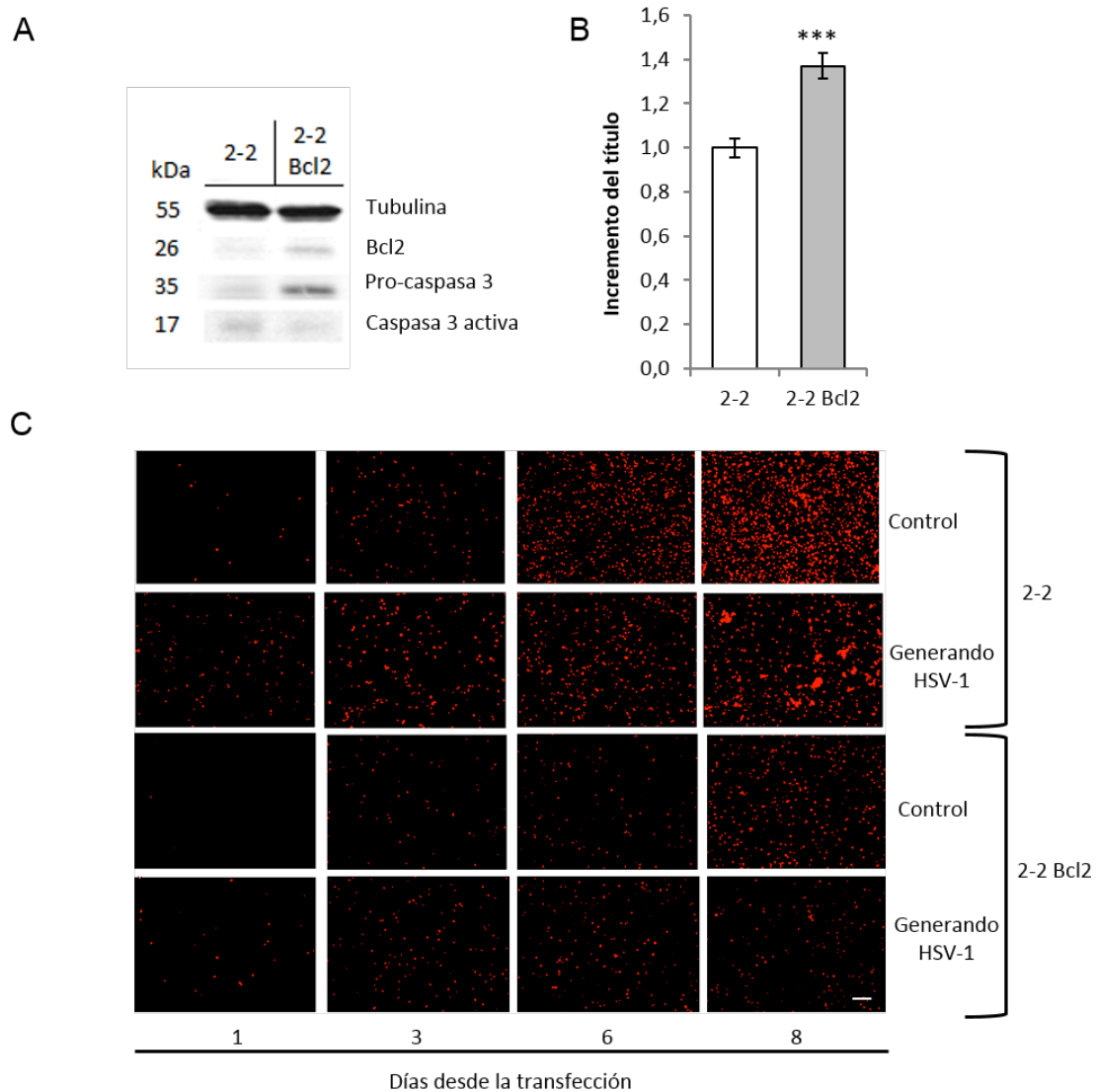


Figura 16. Caracterización de la nueva línea celular VERO 2-2-Bcl2. **A.** Resistencia al proceso de apoptosis. En los análisis mediante *wester-blot* de los extractos celulares obtenidos de cultivos VERO 2-2 y VERO 2-2-Bcl2, se observó que la nueva línea celular presenta niveles más elevados de Bcl2, pro-caspasa3 y caspasa 3 activa respecto la línea parental. **B.** Cuantificación del título total generado. La titulación en siembras de G 16-9 un incremento muy significativo en el título de los vectores HSV-1 generados con la línea VERO-2-2-Bcl2. Se muestran los valores medios de tres ensayos distintos. Se utilizó la prueba *t-Student* para la obtención de la significancia (***) $p < 0,001$. **C.** Niveles de muerte celular durante un proceso de generación de vectores HSV-1. La tinción con yoduro de propidio muestra unos niveles más bajos de muerte celular en la nueva línea VERO-2-2-Bcl2, tanto durante el proceso de generación de vectores HSV-1 como en el control. Escala 10 μ m.

3.1. Obtención de una nueva línea celular estable para el gen anti-apoptótico Bcl2.

Para mejorar el sistema, se decidió crear una nueva línea celular empaquetadora que expresase el gen anti-apoptótico Bcl2. Para ello se transformó de forma estable la línea celular VERO 2-2,

utilizada hasta ahora para la generación de vectores HSV-1, con un plásmido que contiene dicho gen.

Esta nueva línea, llamada de ahora en adelante VERO 2-2-Bcl2, expresó altos niveles de Bcl2 y pro-caspasa 3, y bajos niveles de caspasa 3 activa respecto de la línea celular VERO 2-2 estándar (Figura 16A). Estos resultados indicaron que la nueva línea celular posee una mayor resistencia al proceso de apoptosis. Además, el ensayo de yoduro de propidio realizado durante un proceso de empaquetamiento, mostró efectivamente unos niveles de muerte celular inferiores en la línea VERO 2-2-Bcl2 respecto la parental (Figura 16C).

Una vez caracterizada la nueva línea celular, se comprobó la eficiencia en el empaquetamiento de vectores herpesvirales. Los resultados mostraron una mejora cercana al 40% en el título obtenido utilizando la línea estable para Bcl2 respecto la línea parental, confirmando que esta nueva línea celular es una plataforma recomendable para la generación de vectores HSV-1 (Figura 16B).

3.2. Optimización del medio de cultivo de las células empaquetadoras.

El proceso de ensamblaje de las partículas virales utiliza toda la maquinaria celular para tal fin, lo que podría implicar una mayor demanda nutricional de las células empaquetadoras para poder desarrollar eficientemente este proceso. Con la finalidad de proveer a las células con todos los suplementos que necesiten para tal fin, el medio de cultivo donde crecen las células VERO 2-2-Bcl2 se suplementó con cuatro complementos distintos: aminoácidos, antioxidantes, poliaminas y glutatión reducido (Figura 17), teniendo en cuenta estudios anteriores sobre las rutas más afectadas durante la generación de partículas virales (Rodrigues et al., 2013).

En la realización de estos ensayos experimentales, los suplementos fueron añadidos al medio de cultivo inmediatamente después de la transfección del DNA necesario para el empaquetamiento, manteniéndose este medio durante los tres días que duró el proceso de obtención de las partículas virales. Al ser añadidos de forma separada, se observó que todos los suplementos provocaron un incremento de la producción, aunque solo el medio suplementado con aminoácidos mostró diferencias significativas respecto del medio no suplementado. Los mayores rendimientos se obtuvieron mediante la combinación de varios suplementos, alcanzándose la máxima eficiencia cuando son añadidos al medio los cuatro suplementos. En este último caso, la generación de vectores HSV-1 se incrementó en 2,3 veces respecto del medio no suplementado (Figura 17).

Una vez comprobada la mejora de la eficiencia al utilizar un medio suplementado con aminoácidos, antioxidantes, poliaminas y glutatión reducido, se quiso comprobar si el proceso de empaquetamiento se podría alargar más de tres días en estas condiciones optimizadas. Sin

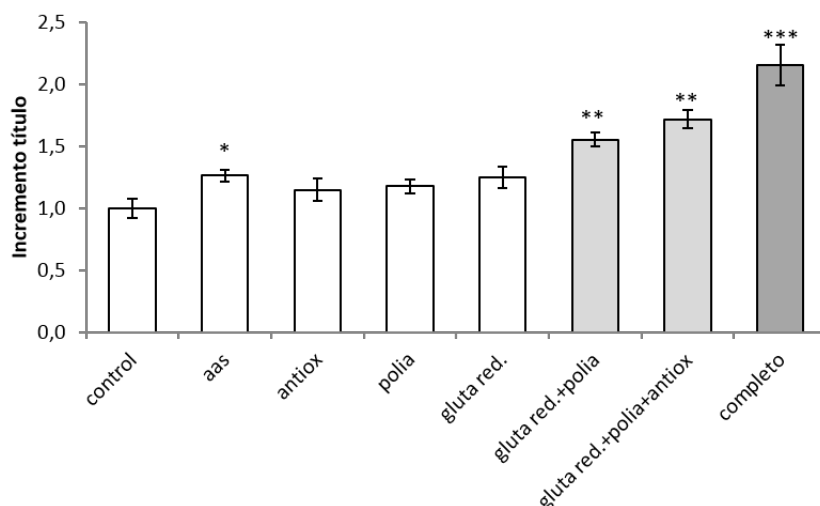


Figura 17. Optimización del medio de cultivo de las células empaquetadoras. Durante el proceso de generación de los vectores HSV-1, el medio de cultivo de las células VERO 2-2-Bcl2 se suplementó con aminoácidos (aas), antioxidantes (antiox.), glutatión reducido (gluta. red.) o poliaminas (polia.) (barras blancas). También se testaron distintas combinaciones de suplementos (barras gris claro) y la combinación de todos ellos (barra gris oscuro). Se observó un incremento de título cada vez mayor a medida que se combinaban más suplementos, siendo muy significativo el incremento obtenido con el medio suplementado con todos ellos. Se muestran los valores medios de tres ensayos distintos. Se utilizó la prueba *t-Student* para la obtención de la significancia (***) $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).

embargo, la producción bajó considerablemente tras tres días de proceso tanto en la línea VERO 2-2-Bcl2 como en la parental (Figura 18A). Posiblemente se deba a la acumulación de residuos en el medio celular que estuviese provocando la inactivación de las partículas virales. Estos resultados nos llevaron a plantear la opción de recoger y renovar el medio cada 48 horas y así intentar alargar el proceso de empaquetamiento. Sin embargo, de nuevo se comprobó que tras 3 días de empaquetamiento el rendimiento bajaba muy significativamente (Figura 18B). Estos resultados sugirieron que al cabo de 3 días se pierden los DNAs necesarios para el empaquetamiento (por dilución durante la división celular), dado el carácter transitorio de la transfección.

Por tanto, el proceso más eficiente para la obtención de vectores HSV-1 se obtiene tras 3 días de empaquetamiento utilizando la nueva línea VERO 2-2-Bcl2 y suplementando el medio de cultivo con aminoácidos, antioxidantes, poliaminas y glutatión reducido.

3.3. Mejora de la eficiencia de empaquetamiento de un BAC en vectores HSV-1

Una de las características más interesantes de los vectores HSV-1 es su gran capacidad de almacenamiento, de hasta 150 kb de DNA exógeno. Por este motivo se quiso comprobar la

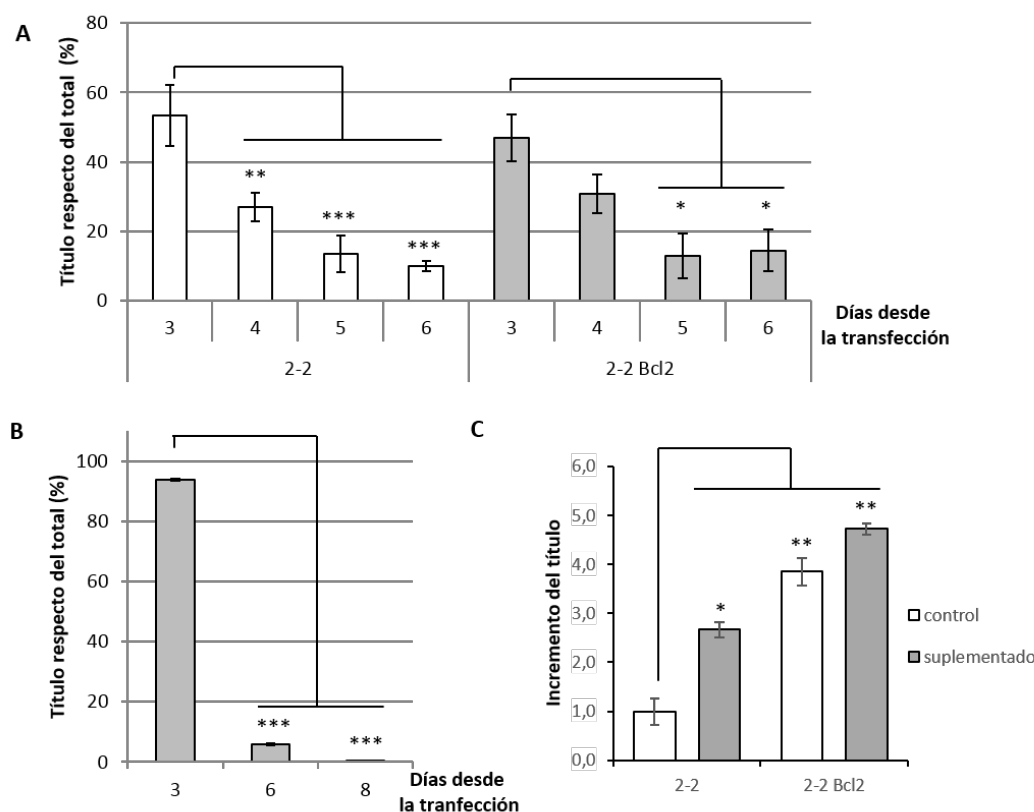


Figura 18. Estrategias para aumentar el título mediante la ampliación del periodo de generación de vectores HSV-1 y la renovación del medio de cultivo; y empaquetamiento de vectores HSV-1 portadores de un BAC. **A.** Decrecimiento del título obtenido cuanto mayor número de días están las células empaquetadoras generando vectores HSV-1. Tanto en la línea celular VERO 2-2-Bcl2 como la parental, el título obtenido se reduce significativamente pasados 3 días desde el inicio del proceso de generación de vectores HSV-1, siendo mayor el decrecimiento en la línea VERO 2-2 (se consideró como 100% la suma del título obtenido tras los 6 días de proceso). **B.** Renovación del medio de cultivo durante el proceso de empaquetamiento de vectores HSV-1 en la línea VERO 2-2-Bcl2. Los títulos obtenidos en la segunda y en la tercera renovación del medio son muy reducidos respecto de los obtenidos a los 3 días de generación de vectores HSV-1 (se consideró como 100% la suma del título obtenido tras los 8 días de proceso). **C.** Incremento del título de vectores HSV-1 portadores de un BAC. Tras 3 días de proceso de generación de vectores HSV-1 con un BAC empaquetado, se observó que la línea VERO 2-2-Bcl2 ya produce más vectores virales que la parental, siendo este incremento aun mayor al suplementar el medio de cultivo. Se muestran los valores medios de al menos tres ensayos distintos. Se utilizó la prueba *t-Student* para la obtención de la significancia (***) $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).

eficiencia de obtención de partículas herpesvirales que llevasen almacenado un BAC de 135 kb utilizando las nuevas condiciones optimizadas.

Por un lado, se observó que la adición de nutrientes al medio de cultivo utilizando la línea empaquetadora VERO 2-2 ya produjo un incremento del título de los sobrenadantes víricos obtenidos, llegándose casi a triplicar el rendimiento (Figura 18C). Por otro lado, la utilización de la línea empaquetadora VERO 2-2-Bcl2 sin suplementar el medio mostró un incremento del título

de hasta 4 veces superior respecto al de la línea parental, y este aumento del título llegó a ser de hasta 4,7 veces superior a las condiciones iniciales cuando se combinó la utilización de la línea VERO 2-2-Bcl2 con la suplementación completa del medio de cultivo (Figura 18C).

4. Modificación de vectores HSV-1 para su uso en terapia génica de la AF

Como ya hemos comentado anteriormente, los vectores HSV-1 poseen varias ventajas que les convierten en una herramienta interesante para su uso en terapia génica del SNC: gran capacidad de almacenamiento, transducción de una gran variedad de células hospedadoras, capacidad de infectar tanto células en división como quiescentes, y alta eficacia en la transducción de neuronas. Sin embargo, los vectores HSV-1 no pueden atravesar la BHE, lo cual supone una importante limitación a la hora de poder ser utilizados en terapia génica del SNC.

Para permitir que los vectores HSV-1 puedan atravesar dicha barrera se estableció una colaboración con el grupo del Profesor Ernest Giralt (IRB Barcelona), el cual posee una gran experiencia en el diseño y caracterización de péptidos que permiten atravesar la BHE (Prades et al., 2012, Teixido and Giralt, 2008). Así, los vectores HSV-1 fueron generados en nuestro laboratorio y enviados al IRB Barcelona, donde fueron modificados y caracterizados a nivel físico-químico (procedimientos realizados por Pol Arranz, del grupo del Prof. Ernest Giralt), para posteriormente realizar la evaluación biológica *in vitro* e *in vivo* en nuestro laboratorio. Los resultados obtenidos se exponen a continuación.

4.1. Modificación y caracterización de vectores HSV-1 a pequeña escala

En los últimos años se han desarrollado diferentes tipos de péptidos lanzadera que permiten atravesar la BHE. En nuestro caso, se decidió utilizar el péptido H-THRPPMWSPVWP-NH₂ (THR) en su versión retro-enantio (rD-THR) (Figura 19A), el cual fue desarrollado recientemente por el grupo del Prof. Ernest Giralt (Prades et al., 2015). Este péptido es capaz de unirse a los receptores de la transferrina y atravesar la BHE mediante un mecanismo de transcitosis mediada por receptor. La construcción retro-enántio es una versión mejorada del péptido que le otorga la ventaja de no ser reconocido por las proteasas del suero al estar conformado por D-aminoácidos, aumentando su vida media sin que su capacidad de unión al receptor se vea afectada.

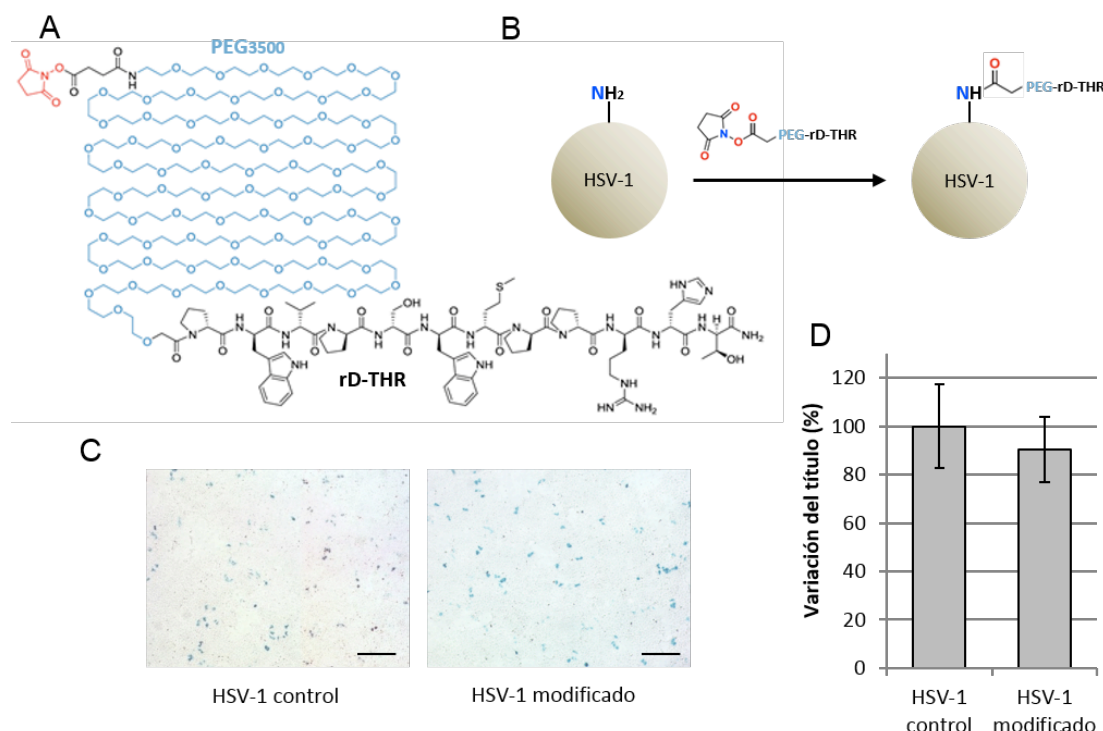


Figura 19. Modificación química de los vectores HSV-1 con el péptido lanzadera rD-THR. **A.** Molécula del péptido lanzadera rD-THR. En rojo se marca el grupo NHS-éster utilizado para su unión química a las lisinas de las glicoproteínas de los vectores HSV-1; en azul la molécula espaciadora PEG (polietilenglicol); y en negro el péptido rD-THR. **B.** Bioconjugación del péptido lanzadera rD-THR con las lisinas. **C.** Titulación de los vectores HSV-1 modificados con el péptido rD-THR. Los vectores modificados fueron añadidos a siembras de G 16-9, y tras 48 horas, se realizó la tinción X-Gal Violeta durante 2 horas. Escala 10 µm. **D.** Variación del título de los vectores HSV-1 modificados. El cómputo del número de células teñidas no varió significativamente respecto del título obtenido previamente a la modificación. Se muestran los valores medios de cinco ensayos distintos. Se utilizó la prueba *t-Student* para la obtención de la significancia.

Los receptores de la transferrina son una diana interesante debido a que están altamente expresados en la vasculatura del SNC y participan en el mecanismo de entrada de hierro al cerebro (Burdo et al 2004). Además, está descrito que este tipo de receptores tiene una mayor expresión en las células endoteliales de la BHE que otro tipo de receptores diana tradicionalmente utilizados en terapia del SNC (Uchida et al 2011).

Por otro lado, es importante tener en cuenta que el péptido lanzadera puede ser enmascarado por las proteínas de alrededor o por la propia conformación de la bicapa lipídica. Para evitarlo, se decidió utilizar la molécula espaciadora PEG (polietilenglicol), la cual no es tóxica, ni inmunogénica y está aprobada por la FDA (Veronese & Pasut, 2005) (Figura 19A).

La adición del péptido al vector HSV-1 puede realizarse siguiendo diferentes estrategias dependiendo del lugar de anclaje elegido de la envuelta: lípidos de la bicapa, azúcares de las glicoproteínas o directamente a residuos proteicos. Finalmente, se decidió seguir esta última estrategia y unir el péptido lanzadera a residuos de lisina (Figura 19B), ya que es un residuo abundante, permite realizar la reacción en un solo paso (lo que implica una menor manipulación), no requiere del uso de detergentes (la envuelta lipídica se podría ver afectada), y se espera que los cambios que se puedan producir en la estructura proteica no afecten a la infectividad del vector HSV-1.

Dado que el gen que lleve almacenado el vector no influye en su proceso de modificación, se optó por utilizar en una primera fase un plásmido pequeño con el gen de la β -galactosidasa (8,1 kb), el cual nos permitió una detección sencilla y rápida de las células transducidas. Una vez que los vectores HSV-1 fueron modificados y caracterizados físico-químicamente, estos fueron titulados en siembras de células G16-9 (línea utilizada normalmente para titular vectores HSV-1). Se observó que la modificación de las partículas virales no producía una bajada significativa del título (Figura 19C y D). Además, puesto que el método utilizado para titular está basado en la actividad de la β -galactosidasa, estos resultados no solo nos indicaron que la cantidad de vectores virales se mantiene prácticamente inalterada tras el proceso de modificación, sino que tampoco se veía afectada su capacidad infectiva.

4.2. Evaluación de la eficiencia del proceso de modificación de vectores HSV-1 a mayor escala

Una vez comprobada la eficacia del método de modificación de los vectores HSV-1, el siguiente paso consistió en testarlos *in vivo* realizando inyecciones directas en zonas de interés para la AF, como los núcleos profundos del cerebelo, las cuales están especialmente afectados en los pacientes de AF. Dado que los ensayos *in vivo* requieren de mayor cantidad de vectores virales, se realizó un escalado en el proceso de generación de los vectores para conseguir lotes con un mayor título (Figura 20 A y B). Para ello se combinaron cuatro estrategias: (1) utilización de la nueva línea celular estable para Bcl2, (2) suplementación del medio de crecimiento de las células empaquetadoras (ver Resultados 2.), (3) multiplicar x5 el número de placas sembradas utilizadas para generar los vectores HSV-1, y (4) utilizar la nueva tanda de vectores generada anteriormente para resuspender la nueva tanda (Figura 20B). De esta manera se conseguiría un mayor título a la vez que una mayor pureza, al evitarse un paso de lisis celular mecánica y al producirse una menor muerte celular al utilizar la línea VERO 2-2 estable para Bcl2.

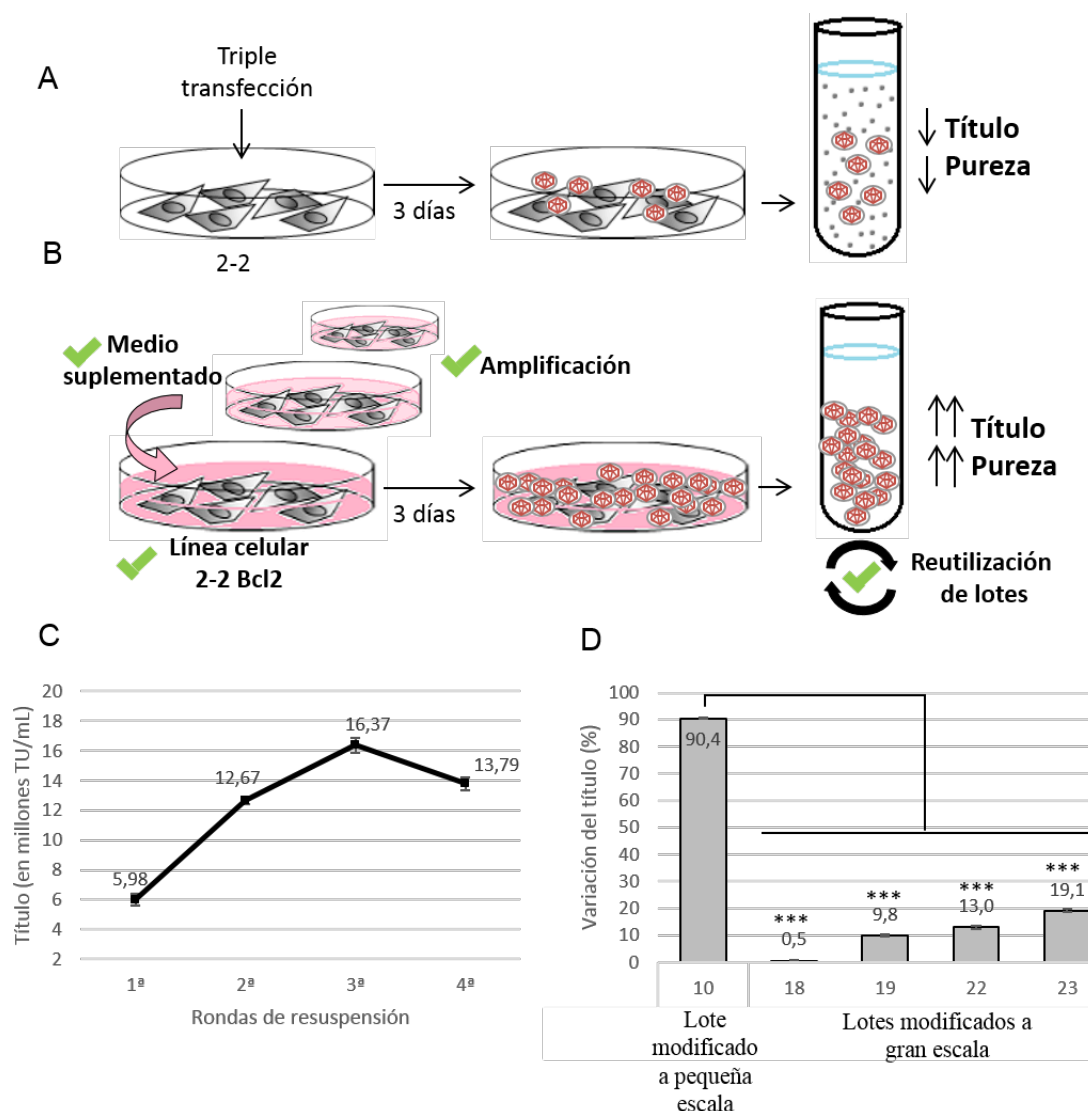


Figura 20. Generación de vectores HSV-1 a mayor escala. **A.** Protocolo seguido hasta el momento para la obtención de vectores HSV-1. En siembras de VERO 2-2 se realizaba la triple transfección de todos los DNAs necesarios para la generación de los vectores HSV-1, y tras 3 días se procedía a su recolección. La alta muerte celular causada durante el proceso reducía los niveles de pureza de los sobrenadantes virales. **B.** Representación esquemática de las distintas estrategias aplicadas para la obtención de títulos más elevados. Se combinó la utilización de la nueva línea celular VERO 2-2-Bcl2, la realización del proceso de empaquetamiento en un mayor número de placas (amplificación), la suplementación del medio de cultivo y la reutilización del lote anterior para resuspender la nueva tanda de vectores HSV-1 generados. **C.** Incremento del título de los vectores HSV-1 aplicando la nueva estrategia de generación. La eficiencia obtenida fue menor de la esperada, observándose una bajada del título tras la cuarta ronda de reutilización de lotes anteriores. **D.** Eficiencia del proceso de modificación de los vectores HSV-1 a mayor escala. La utilización de títulos y concentraciones altos tuvo una afección directa en la eficiencia del proceso de modificación de los vectores HSV-1, obteniéndose una bajada de entre el 80 y el 95% del título respecto del inicial.

A pesar de conseguir aumentar el título de los lotes siguiendo esta metodología (Figura 20C), el aumento que se alcanzó tras las sucesivas tandas de empaquetamiento de vectores HSV-1 no fue tan grande como se cabría esperar. Posiblemente esto se pudo deber a la inactivación o destrucción de los vectores herpesvirales tras los continuos procesos de congelación/descongelación (conservación y utilización de los lotes) y de resuspensión realizados necesariamente durante el proceso.

Una vez obtenidos lotes con títulos más elevados, estos fueron modificados en el IRB Barcelona. Sorprendentemente, en esta ocasión si se observó que el proceso de modificación provocaba una gran bajada de título, llegándose a perder hasta un 80% en el mejor de los casos respecto del título original (Figura 20D). A pesar de los continuos intentos, el rendimiento del proceso era tan bajo que hacía inviable poder testar los vectores HSV-1 modificados *in vivo*. En los últimos lotes se consiguió mejorar la eficiencia (Figura 20D), pero continuó siendo insuficiente.

Debido al bajo rendimiento en el proceso de modificación, junto con el alto coste y dificultad que supone la generación de los vectores HSV-1, se decidió explorar una estrategia de terapia génica alternativa basada en nanopartículas, la cual se desarrolla a continuación.

5. Nanopartículas funcionalizadas: nueva estrategia de terapia génica para la AF

5.1. Generación de nanopartículas funcionalizadas

Actualmente se están desarrollando distintas estrategias de terapia génica basadas en vectores no virales, como por ejemplo las nanopartículas (NPs) formadas por polímeros sintéticos. De nuevo, en colaboración con el grupo del Prof. Ernest Giralt del IRB Barcelona, se generaron NPs de polímero PLGA (*Poly-lactide-co-glycolide Acid*), el cual cuenta con varias ventajas que ya fueron descritas anteriormente (ver Introducción). Además, para aumentar la eficiencia de la encapsulación del DNA, se utilizó también el polímero catiónico PEI (Polietilenimina), el cual a su vez favorece la internalización celular y el escape endosomal (Sun and Zhang, 2010).

Para permitir el paso de las NPs a través de la BHE, estas fueron funcionalizadas mediante la unión directa al PLGA de dos péptidos lanzadera: el reto-enantio-péptido rD-THR (el mismo que se utilizó para modificar los vectores HSV-1) y un CPP (*Cell Penetrating Peptide*) denominado r8, un péptido de argininas que favorece la internalización celular de la NP a la que se le une (Takeuchi and Futaki, 2016).

El proceso de generación de las NPs está esquematizado en la Figura 21A. En primer lugar, se mezcla el DNA con el polímero catiónico PEI, formándose NPs DNA-PEI tras 30 minutos de agitación con imán. Posteriormente, se añade progresivamente el polímero PLGA funcionalizado (unido a rD-THR, r8 o ambos), el cual puede estar disuelto en acetona o DMSO (dimetilsulfóxido), y tras 12 horas en agitación con imán se generan las NPs PLGA-PEI-DNA. Durante todo este trabajo, las NPs fueron generadas y caracterizadas a nivel físico-químico por Josep García del grupo del Prof. Ernest Giralt, y posteriormente enviadas a nuestro laboratorio para ser testadas tanto *in vitro* como *in vivo*.

Una de las técnicas utilizadas para la caracterización físico-química de las NPs fue la Dispersión de Luz Dinámica (DSL, *Dynamic Light Scattering*). Este análisis nos ofrece datos sobre dos parámetros de gran relevancia: tamaño y polidispersión de las NPs. Este último parámetro indica el grado de variación del tamaño de las NPs en una muestra, siendo mejor cuanto más cercano a 0 sea el valor de este parámetro. En todos los casos, las NPs utilizadas en los distintos ensayos tuvieron un tamaño de entre 100 y 200 nm, y una polidispersión no superior a 0,3.

5.2. Elección del método de generación de NPs

Como se ha indicado anteriormente, existen dos métodos para generar las NPs dependiendo de si el polímero PLGA está disuelto en acetona o en DMSO. Para determinar cuál es el método más adecuado, se generaron NPs funcionalizadas con uno o ambos péptidos (rD-THR y/o r8) y portadoras de un plásmido que codifica para el cDNA de la frataxina unido a las marcas Myc y DDK.

La línea celular utilizada fue la SH-SY5Y, la cual deriva de un neuroblastoma humano y que tras un protocolo de diferenciación de 10 días previamente desarrollado en nuestro laboratorio (ver Materiales y Métodos; Figura 21B), es posible obtener células similares a neuronas maduras humanas con morfología multipolar y abundantes dendritas (Figura 21C).

Para este ensayo, las NPs estuvieron 4 horas en contacto con las SH-SY5Y diferenciadas, y tras 48 horas se realizaron extractos celulares que fueron analizados por *Western-blot* (Figura 21D). La técnica de revelado Odyssey nos permite realizar un doble marcaje mediante la utilización de anticuerpos contra la frataxina (verde) y la marca Myc (rojo), pudiéndose diferenciar la FXN endógena (verde) de la generada por la expresión del plásmido (amarillo, al ser detectada por ambos anticuerpos). Como control positivo se realizó una lipofección (ver Materiales y Métodos) con el mismo plásmido que llevaban las NPs. El control negativo son células sin tratar.

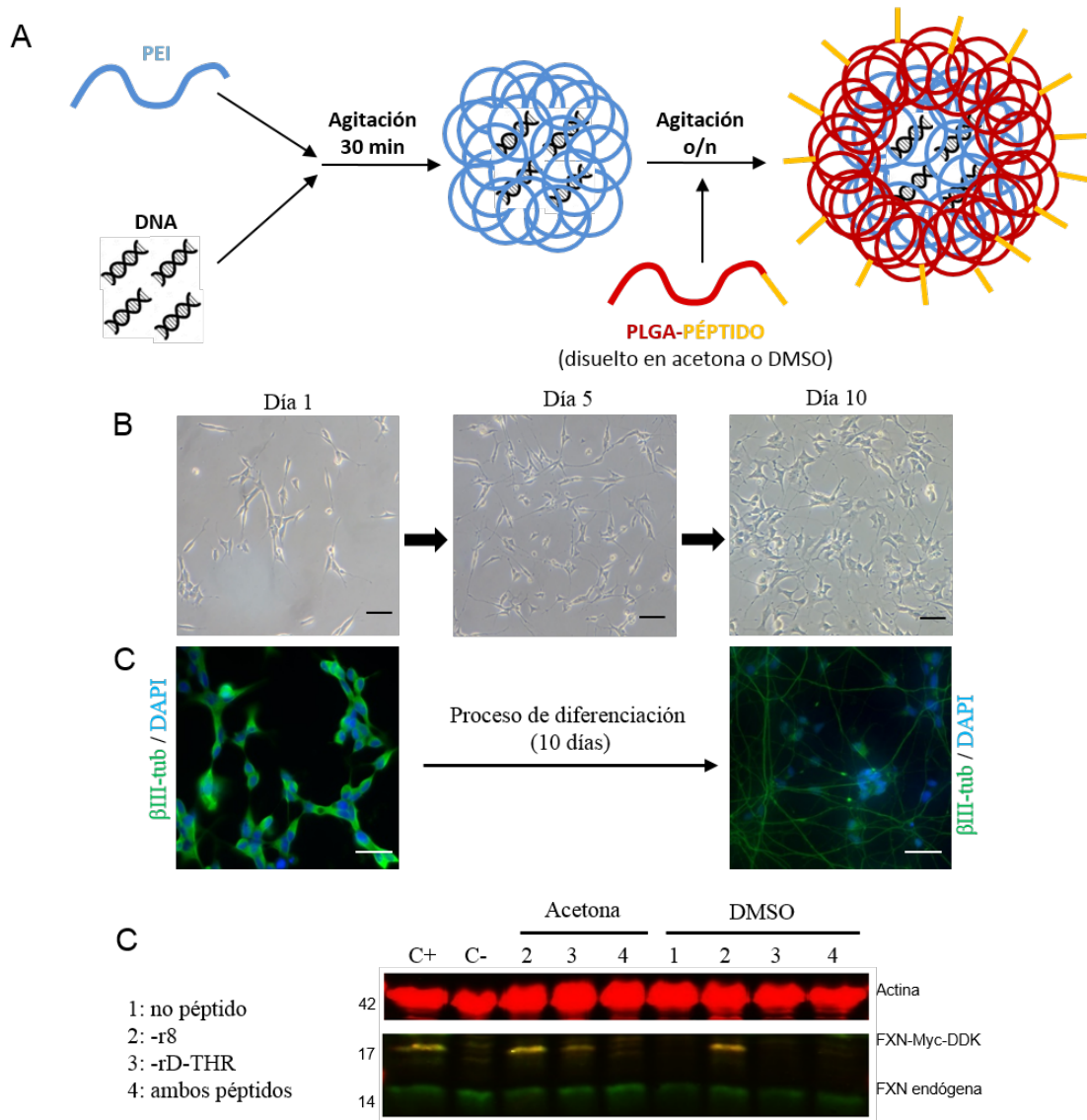


Figura 21. Generación de NPs funcionalizadas y ensayo *in vitro* en células similares a neuronas maduras humanas. **A.** Representación esquemática del proceso de generación de las NPs funcionalizadas. En primer lugar, se mezcla durante 30 min el DNA con el polímero catiónico PEI (Polietilenimina), formándose NPs DNA-PEI. Posteriormente, se añade progresivamente el polímero PLGA (*Poly-lactide-co-glycolide Acid*) funcionalizado (unido a rD-THR, r8 o ambos), el cual puede estar disuelto en acetona o DMSO. Pasadas 12 horas en agitación con imán, se generan las NPs de PLGA-PEI-DNA. **B.** Diferenciación de la línea celular SH-SY5Y. El proceso seguido para obtener células similares a neuronas fue previamente establecido en el laboratorio (ver Materiales y métodos). Fotografías con un microscopio de campo claro a distintos días del proceso de diferenciación. Escala 20 µm. **C.** Tinción inmunohistoquímica de células SH-SY5Y antes y después de ser diferenciadas. Se utilizó el anticuerpo contra βIII-tubulina (componente de los microtúbulos que se expresa principalmente en neuronas; verde) y DAPI (núcleos celulares; azul), observándose la gran cantidad de ramificaciones neurales presentes tras 10 días de diferenciación. Escala 20 µm. **D.** Expresión en células SH-SY5Y del cDNA de la frataxina con las marcas Myc y DDK. Las NPs funcionalizadas con el plásmido del cDNA de FXN encapsulado estuvieron en contacto 4 horas con la siembra celular, y pasadas 48 horas se realizaron extractos celulares y análisis por *Western-blot*. Se utilizaron anticuerpos contra la frataxina (verde) y la marca Myc (rojo), pudiéndose diferenciar la FXN endógena (verde) de la generada por la expresión del plásmido (amarillo, al ser detectada por ambos anticuerpos). Como control positivo se realizó una lipofección con el mismo plásmido que llevaban las NPs. El control negativo son células sin tratar.

Los resultados muestran que las NPs generadas mediante la utilización de DMSO como disolvente orgánico del PLGA afecta al péptido rD-THR y las NPs no se internalizan, a diferencia de las generadas mediante el método en el que el PLGA está disuelto en acetona, donde si se observa señal. Mediante ambos métodos, las NPs con el péptido r8 son funcionales, mientras que en las células en las que se añadieron NPs funcionalizadas con ambos péptidos no se observó expresión del plásmido (Figura 21D).

Según estos resultados, y dada la importancia que supone la presencia del péptido lanzadera rD-THR en las NPs, nos decantamos por utilizar el método que utiliza la acetona como disolvente del PLGA para la formulación de las NPs. Sin embargo, también era de nuestro interés generar NPs funcionalizadas con ambos péptidos, y dado que en este ensayo no habían funcionado, fue necesaria la realización de un proceso de optimización de la formulación antes de continuar con otro tipo de ensayos *in vivo* e *in vitro*.

5.3. Determinación de la formulación y tiempo óptimos

Como se ha comentado anteriormente, las NPs están conformadas por dos tipos de polímeros y dos tipos péptidos distintos. La modificación de los ratios entre unos y otros influye en aspectos tan importantes como su capacidad de encapsulación de DNA, internalización celular, escape endosomal, liberación de DNA, etc. Por tanto, fue necesaria la realización de varios ensayos *in vitro* para determinar la formulación óptima de las NPs (Figura 14).

Las NPs fueron testadas sobre siembras de células SH-SY5Y sin diferenciar y eran portadoras esta vez de un plásmido con el gen de la β -galactosidasa, lo que permitió agilizar y facilitar la detección mediante la tinción X-Gal Violeta de aquellas células en las que las NPs se hubiesen internalizado y se estuviese expresando el gen. Todas las formulaciones fueron generadas mediante el método que utiliza la acetona como disolvente del PLGA y con una concentración de plásmido de 50 $\mu\text{g/mL}$ (concentración optimizada por el grupo de Ernest Giralt). Los resultados obtenidos atendiendo a los distintos parámetros estudiados fueron:

- **Tiempo en contacto con las células:** Tiempos cortos podrían no ser suficientes para que las NPs se internalicen en las células, mientras que tiempos largos podrían resultar tóxicos. Las NPs estuvieron 2, 4 y 6 horas en contacto con las células. Se observó una relación directa entre el tiempo y el número de células teñidas, aunque a partir de las 4 horas las diferencias nos fueron significativas. Además, no se observó toxicidad en ninguno de los tiempos (Figura 22A).
- **Concentración de PLGA:** El polímero PLGA puede utilizarse en distintas concentraciones para la generación de NPs. Concentraciones bajas de polímero podrían ser insuficientes para

la formación correcta de las NPs, mientras que concentraciones elevadas podrían resultar tóxicas. Para determinar cuál era la concentración óptima se testaron dos valores distintos: 3 mg/mL y 6 mg/mL, observándose un mayor número de células positivas en las testadas con NPs formadas con 3 mg/mL de PLGA (Figura 22B).

- **Ratio DNA:PEI:** El PEI, al ser un polímero catiónico, mejora la encapsulación del DNA y el escape endosomal (ver Introducción). Sin embargo, concentraciones elevadas también pueden causar toxicidad. En este caso se testaron tres ratios DNA:PEI distintos: 1:5, 1:10 y 1:20, obteniéndose los mejores resultados con el ratio 1:10 DNA:PEI (Figura 22C).
- **Péptido lanzadera:** el PLGA puede ser funcionalizado con el péptido lanzadera rD-THR o el CPP r8. Esto permite generar NPs con únicamente uno de los dos péptidos o con la presencia de ambos. Los resultados mostraron que no existen diferencias significativas entre la utilización de un tipo u otro de péptido ni la combinación de ambos (Figura 22D).
- **Ratio de PLGA:PLGA-péptido:** La utilización de una formulación con un porcentaje elevado de PLGA unido a péptidos podría afectar a la correcta conformación espacial de las NPs. Por ello, también se probaron formulaciones con un ratio 1:1 de PLGA:PLGA-péptido, a parte de la formulación estándar con todo el PLGA funcionalizado (ratio 0:1 PLGA:PLGA-péptido). En este caso, tampoco se observaron diferencias significativas entre el uso de un ratio u otro (Figura 22E).

Por tanto, los resultados anteriores nos permitieron determinar que la formulación óptima de las NPs es la formada por 3 mg/mL de PLGA con un ratio DNA:PEI de 1:10, sin que su eficacia se vea afectada por el porcentaje de PLGA funcionalizado ni por el tipo de péptido utilizado (r8, rD-THR o ambos). Además, son necesarias un mínimo de 4 horas para que se produzca una internalización celular correcta.

5.4. Ensayos *in vitro* en cultivos de células neuronales

La finalidad última es poder utilizar las NPs como vectores eficaces en la terapia génica del SNC. Por ello, una vez optimizada la formulación de las NPs, estas fueron testada en dos tipos distintos de cultivos celulares: de nuevo en células SH-SY5Y diferenciadas a células similares a neuronas y en cultivos primarios de neuronas de ratón. Los resultados obtenidos se exponen a continuación.

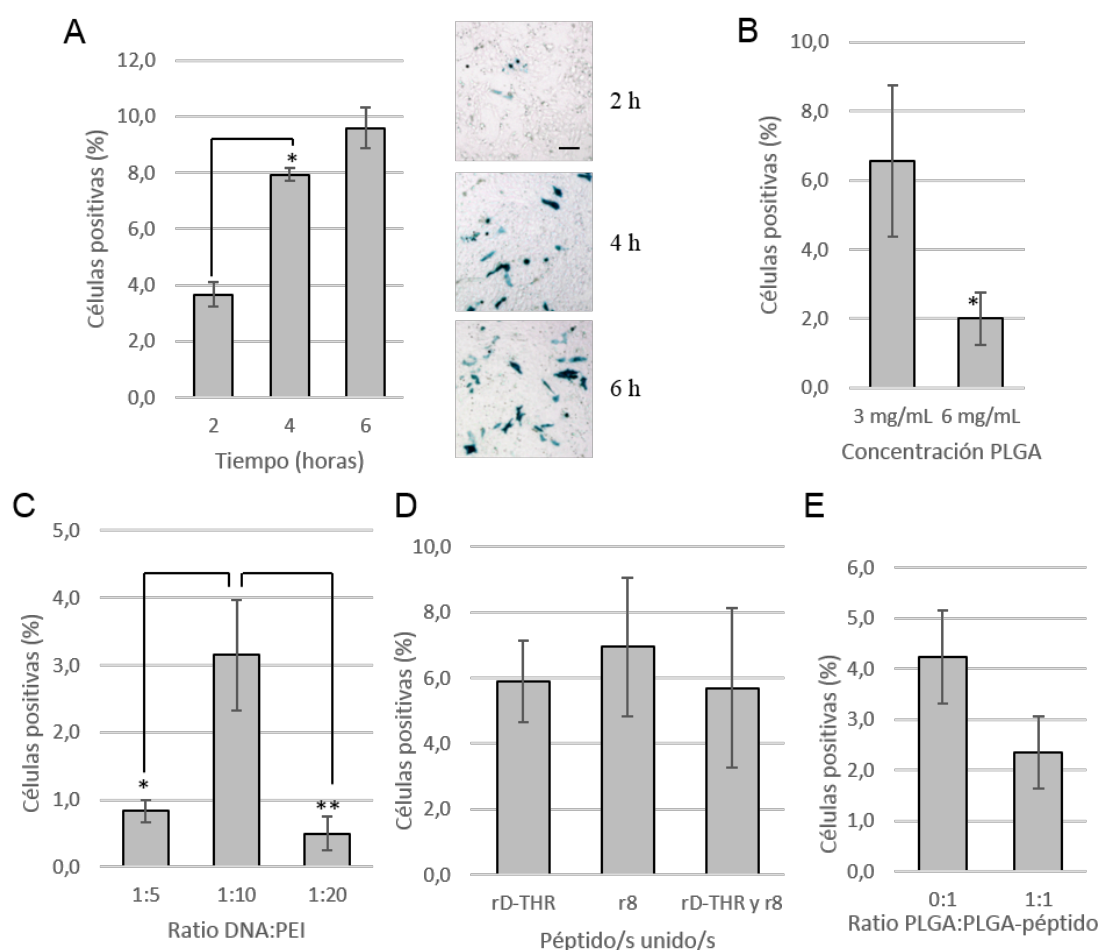


Figura 22. Determinación de la formulación y tiempo óptimos de las NPs. **A.** Tiempo óptimo de contacto entre las NPs y las siembras celulares. Las NPs con el plásmido de la β -galactosidasa estuvieron 2, 4 y 6 horas en contacto con las células, observándose una relación directa entre el tiempo y el número de células teñidas. A partir de las 4 horas las diferencias nos fueron significativas. A la derecha, fotografías representativas tomadas con un microscopio de campo claro de células teñidas con X-Gal Violeta. Escala 20 μ m **B.** Concentración de PLGA. Se testaron dos concentraciones distintas de PLGA: 3 mg/mL y 6 mg/mL, observándose una mayor eficiencia en las NPs formadas con 3 mg/mL de PLGA. **C.** Ratio DNA:PEI. Se ensayaron tres ratios DNA:PEI distintos: 1:5, 1:10 y 1:20, obteniéndose un mayor número de células positivas con el ratio 1:10 DNA:PEI. **D.** Tipo de péptido unido al PLGA. El polímero PLGA puede ser funcionalizado con el péptido lanzadera rD-THR o el CPP r8, de forma individual o con ambos. No se observaron diferencias significativas entre la utilización de un tipo u otro de péptido ni la combinación de los dos. **F.** Ratio PLGA:PLGA-péptido. Las NPs pueden generarse con un porcentaje del PLGA sin estar funcionalizado. Se probaron formulaciones estándar con todo el PLGA funcionalizado (ratio 0:1 PLGA:PLGA-péptido) y también el ratio 1:1. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre el uso de un ratio u otro. Se muestran los valores medios de al menos tres ensayos distintos. Se utilizó la prueba *t-Student* para la obtención de la significancia (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).

5.4.1. Ensayos en células similares a neuronas humanas

Para este ensayo se utilizó la formulación optimizada en los ensayos en SHSY5Y sin diferenciar anteriores: 3 mg/mL PLGA (unido a rD-THR y/o r8), 1:10 DNA:PEI y 50 µg/mL de plásmido (β -galactosidasa). Se volvieron a testar distintos tiempos: 2, 4 y 6 horas. Los resultados muestran lo siguiente:

- Expresión del plásmido: se observó que de nuevo son necesarias un mínimo de 4 horas para que se produzca una internalización eficiente de las NPs, no observándose células teñidas a 2 horas. Sin embargo, la tinción celular X-Gal Violeta no es tan clara como en los ensayos en SH-SY5Y sin diferenciar, observándose señal únicamente en el soma celular y no en las ramificaciones (Figura 23A). Además, fue necesaria una tinción X-Gal Violeta más prolongada (6 horas respecto de las 2-3 horas empleadas normalmente). Esto podría deberse a que, en este tipo celular, la expresión del plásmido fuese más débil.
- Toxicidad: la exposición de las NPs durante 6 horas resulta muy tóxica, provocando una gran muerte celular. Sin embargo, aunque a 4 horas también se produce una mayor muerte celular que a 2 horas (Figura 23B), la morfología celular de las células no se ve afectada, a diferencia de lo que ocurre a 6 horas, donde prácticamente no se observan ramificaciones dendríticas ni axonales (Figura 23A).

Según estos resultados, podemos concluir que en células similares a neuronas maduras humanas las NPs no se internalizan tan eficazmente y que el nivel de expresión del plásmido es menor que en SH-SY5Y sin diferenciar, además de que a tiempos superiores a 4 horas resultan tóxicas.

5.4.2 Ensayos en cultivos primarios de neuronas de ratón

Las células similares a neuronas humanas utilizadas en el apartado anterior proceden de una línea celular obtenida a partir de un tumor, por lo que podrían presentar algunas alteraciones moleculares. Por este motivo, también se realizaron cultivos primarios de neuronas de la corteza cerebral, obtenidas de embriones de 18 días (E18) de ratones C57BL/6. Las células fueron cultivadas según un protocolo descrito previamente (ver Materiales y Métodos). Se comprobó que estos cultivos estaban conformados por un 95% de neuronas maduras de morfología multipolar (Figura 24A), estimándose la presencia de astrocitos en un 5%.

En una primera aproximación, se utilizó el mismo tiempo de contacto (4 horas) y las misma formulación y concentración de NPs que en los ensayos anteriores (considerada como 1X). Sin embargo, resultó ser una concentración y un tiempo excesivamente tóxicos (Figura 24B), por lo

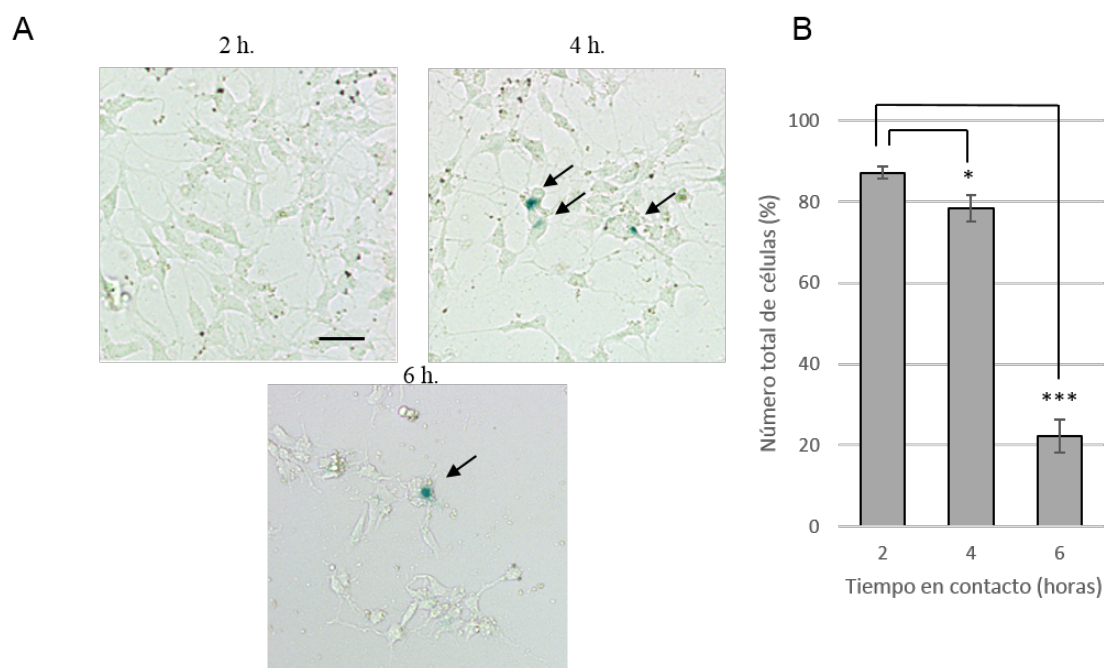


Figura 23. Ensayo de las NPs en células similares a neuronas humanas. Se utilizó de nuevo la línea SH-SY5Y diferenciada tras un protocolo de 10 días (ver Materiales y Métodos). Las NPs utilizadas llevaban encapsulado el plásmido con el gen de la β -galactosidasa **A.** Distintos tiempos de contacto entre las NPs y las siembras celulares. Se testaron distintos tiempos (2, 4 y 6 horas), y tras 48 horas las células se fijaron y tiñeron mediante X-Gal Violeta durante 6 horas. Se observó que fueron necesarias un mínimo de 2 horas para la correcta internalización de las NPs, y una tinción menos intensa que en ensayos realizados en otro tipo de cultivos celulares. Se observa una relación directa entre el número de horas y la pérdida de ramificaciones neurales. Escala 20 μ m. **B.** Toxicidad de las NPs. Se contabilizó el número total de células presentes, observándose que a 4 horas ya hay un descenso significativo de células, pero que es mucho más acusado a las 6 horas de permanecer en contacto con la siembra celular. Se muestran los valores medios de al menos tres ensayos distintos. Se utilizó la prueba *t-Student* para la obtención de la significancia (***) $p < 0,001$, * $p < 0,05$).

que se testaron concentraciones (0,125X; 0,25X; 0,5X y 0,75X) y tiempos (1,5 y 3 horas) inferiores a los testados hasta ahora. La formulación empleada fue:

3 mg/mL PLGA : PLGA-rD-THR : PLGA-r8 (2:1:1), 50 μ g/mL de DNA; ratio DNA:PEI 1:10

En este ensayo se obtuvieron los siguientes resultados:

- Eficiencia de las NPs: el número de células teñidas fue similar al observado en las SH-SY5Y diferenciadas (Figura 24C), aunque hay que tener en cuenta que se han utilizado concentraciones inferiores, por lo que la eficiencia fue mayor.
- Expresión del plásmido: en este tipo de cultivo, la tinción de las células (directamente relacionado con el nivel de expresión del plásmido) es intensa y con una distribución

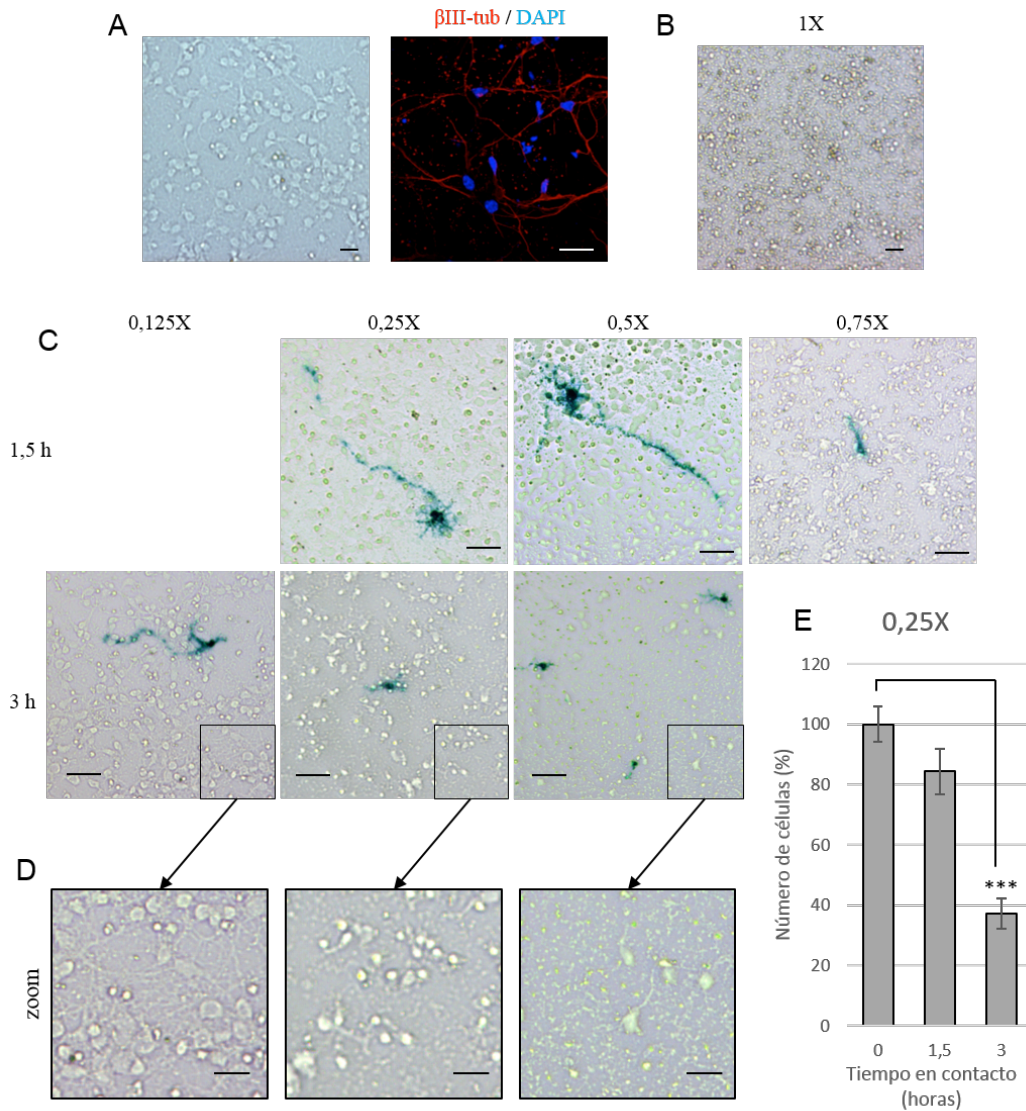


Figura 24: Ensayo de las NPs funcionalizadas en cultivos primarios de neuronas de la corteza cerebral de ratón. Las NPs utilizadas llevaban encapsulado el plásmido con el gen de la β -galactosidasa. Los cultivos primarios de neuronas de la corteza cerebral se obtuvieron de embriones de 18 días (E18) de ratones C57BL/6. Las células fueron cultivadas según un protocolo descrito previamente (ver Materiales y Métodos). Fotografías con un microscopio de campo claro. Escala 20 μ m y 5 μ m (zoom) **A.** Cultivos primarios de neuronas de corteza cerebral de ratón. Fotografías de campo claro (izquierda) y tinción inmunohistoquímica contra β III-tubulina (componente de los microtúbulos que se expresa principalmente en neuronas; rojo) y DAPI (núcleos celulares; azul), observándose la gran cantidad de ramificaciones neurales existentes. Escala 20 μ m. **B.** Toxicidad de la concentración 1X. La concentración utilizada anteriormente (1X) en los ensayos con SH-SY5Y diferenciada y durante 4 horas, resultó muy tóxica, observándose una gran muerte neuronal y la presencia de muchos residuos. **C.** Concentraciones y tiempos óptimos. Se testaron concentraciones inferiores a la 1X (0,125X; 0,25X; 0,5X y 0,75X) a 1,5 y 3 horas. Se observó que a 3 horas resultan tóxicas, del mismo modo que concentraciones superiores a 0,5X. Se observó una tinción clara de toda la extensión de la neurona a concentraciones 0,25X y 0,5 durante 1,5 horas en contacto con las NPs. **D.** Toxicidad de las NPs. Zoom de las siembras que estuvieron 3 horas en contacto con las NPs. Se observa la gran pérdida de ramificaciones a concentraciones ascendentes. **E.** Toxicidad de las NPs. Se contabilizó el número total de células presentes, no observándose una bajada significativa a las 1,5 horas, mientras que a 3 horas la muerte celular es muy alta. Se muestran los valores medios de al menos tres ensayos distintos. Se utilizó la prueba *t-Student* para la obtención de la significancia (***) $p < 0,001$.

amplia por todo el citosol. Además, esta señal se obtuvo tras un tiempo de tinción estándar (2-3 horas). Por otro lado, se produce una mayor internalización a 3 que a 1,5 horas de exposición de las NPs en los cultivos neuronales (Figura 24C).

- Toxicidad: la concentración 0,75X también resultó muy tóxica como ocurrió con la 1X, observándose una gran muerte celular incluso a 1,5 horas (Figura 24C). Por otro lado, a las 3 horas de estar las NPs en contacto con las células resultaron más tóxicas que a 1,5 horas (Figura 24C y D). Además, a 1,5 horas se observaron un mayor número de células positivas con grandes ramificaciones (Figura 24C).

De acuerdo con estos resultados, podemos concluir que en los cultivos de neuronas de corteza cerebral de ratón las NPs con la formulación 3 mg/mL PLGA : PLGA-rD-THR : PLGA-r8 (2:1:1), 50 µg/mL de DNA; DNA:PEI 1:10 funciona y no resultan tóxicas a concentraciones de entre 0,25 y 0,5X y con un tiempo de contacto con las células no superior a 1,5 horas.

5.5. Ensayos *in vivo*: inyecciones directas en cerebelos de ratón

Una vez comprobado que las NPs son capaces de internalizarse en distintos tipos de cultivos neurales y expresar el plásmido que llevan encapsulado, el siguiente paso consistió en comprobar si estas eran capaces de funcionar en un organismo vivo. Para ello, se realizaron distintos tipos de inyecciones estereotáxicas en zonas de interés para la AF, como los núcleos profundos del cerebelo (DCN, *Deep Cerebellar Nuclei*) (Figura 25A).

5.5.1. Funcionalidad y distribución de las NPs *in vivo*

Para realizar este ensayo se utilizó de nuevo la formulación optimizada en los ensayos *in vitro*: 3 mg/mL PLGA-péptido, 1:10 DNA:PEI. El plásmido encapsulado fue el que expresa el gen de la β -galactosidasa (8,1 kb), y como control negativo se utilizaron NPs con la misma formulación pero sin plásmido. Como control positivo se utilizaron los vectores HSV-1, los cuales llevaban empaquetado el mismo plásmido.

Del mismo modo que ocurrió con los vectores HSV-1, en los ensayos *in vivo* con NPs se requirió una mayor concentración de las soluciones inyectadas respecto de las usadas *in vitro*. Sin embargo, la formación de agregados a concentraciones superiores a 3X impidió que las soluciones pudieran ser absorbidas por la aguja estereotáxica e inyectarlas en el cerebelo, por lo que nos vimos obligados a utilizar esta concentración máxima de 3X para la realización de los distintos ensayos *in vitro*.

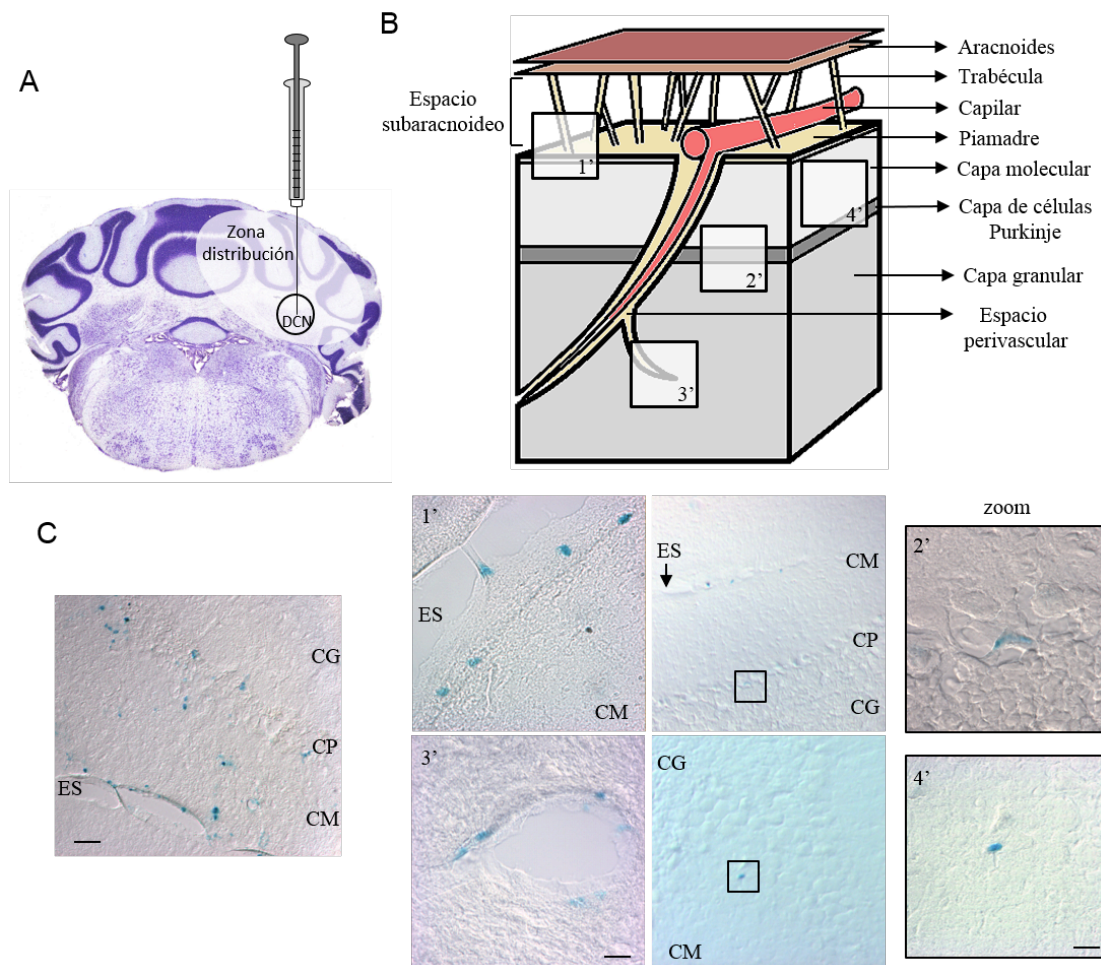


Figura 25. Ensayos *in vivo* con NPs funcionalizadas: Tinciones X-Gal Violeta. Se inyectaron 10 μ L de las NPs funcionalizadas a una concentración 3X en los núcleos profundos del cerebelo (DCN, *Deep Cerebellar Nuclei*). Estas NPs portaban un plásmido con el gen de la β -galactosidasa. Tras 72 horas, los cerebelos fueron extraídos y teñidos mediante X-Gal Violeta durante 4 horas. **A.** Representación de la zona de inyección. Se observó una distribución amplia por toda la mitad del cerebelo en la que se había realizado la inyección, especialmente en la corteza cerebelar. **B.** Distribución de las NPs en el cerebelo de ratón. Arriba, representación de un corte coronal del cerebelo de ratón, en la que están identificadas distintas estructuras, como las meninges (aracnoides y piamadre) y las capas molecular, granular y de células Purkinje, entre otras. Abajo, fotografías tomadas con un microscopio de campo claro. Se observaron células teñidas en la piamadre (1'), en la capa de células de Purkinje (2'), en el espacio perivascular (3') y en la capa molecular (4'). Escala 20 μ m (10 μ m zoom). **C.** Patrón de distribución de vectores HSV-1 inyectados en DCN. Se realizaron inyecciones estereotáxicas en las mismas condiciones que con las NPs. La señal observada es muy similar a la obtenida por las NPs, con la diferencia de la gran cantidad de células teñidas debido a la mayor concentración inyectada. Escala 50 μ m. Abreviaturas: CG, Capa Granular; CM, Capa Molecular; CP, Capa de células de Purkinje; ES, Espacio Subaracnoideo.

Una vez inyectadas en el cerebelo de ratón, estos fueron extraídos pasadas 72 horas. Posteriormente, fueron cortados y teñidos mediante la técnica X-gal Violeta durante 4 horas. Los resultados mostraron un amplio patrón de distribución, observándose señal en zonas alejadas de la inyección (Figura 25A), lo que indicó que las NPs se distribuyeron por el espacio subaracnoideo a través del líquido cefalorraquídeo (Figura 25B). Se observaron células teñidas en la piamadre y

en el espacio perivascular (Figura 25B 1' y 3', respectivamente), y también en zonas de la capa molecular y de la capa de células Purkinje (Figura 25B 2' y 4', respectivamente). Este patrón de distribución fue similar al observado por los vectores HSV-1 inyectados en DCN (Figura 25C).

Estos resultados demostraron que las NPs fueron funcionales *in vivo* y que fueron capaces de distribuirse por amplias zonas del cerebelo a través del líquido cefalorraquídeo que circula por el espacio subaracnoideo, alcanzando incluso zonas de la capa molecular y de la capa de células de Purkinje. Sin embargo, aunque el número de células transfectadas fue bajo.

5.5.2. Determinación del tipo celular en el que las NPs se internalizan

El siguiente paso consistió en intentar determinar a qué tipo celular se habían unido las NPs. Como hemos comentado anteriormente, si parece bastante claro que se unan a células endoteliales de la piamadre (Figura 25B 1'). Sin embargo, las señales que se observan en la capa molecular podrían ser varios tipos celulares: astrocitos, oligodendrocitos, células estrelladas, células en cesto, etc., y las células teñidas en la capa de células de Purkinje podrían ser este tipo celular, o también glía de Bergmann.

En los cerebelos inyectados con el control positivo (vectores HSV-1) y teñidos con anticuerpos contra β -galactosidasa, se observó una señal clara (Figura 26A) cuyo patrón coincidió con el observado con la Tinción X-Gal Violeta (Figura 25C). Esta tinción de inmunofluorescencia permitió determinar que las células marcadas a nivel de la capa de células de Purkinje no se corresponden con este tipo celular, sino a células de Bergmann (glía). El soma de estas células también se encuentra en esta capa y sus ramificaciones se extienden por la capa molecular, alcanzando incluso el espacio subaracnoideo (Figura 26A zoom). Sin embargo, a pesar de los reiterados intentos, en ninguno de los cerebelos inyectados con NPs se observó tinción específica contra β -galactosidasa (Figura 26B), por lo que no se pudo determinar el tipo celular en el que se habían internalizado. Esto probablemente se debió a una menor eficiencia de la inmunohistoquímica respecto de la histoquímica con X-Gal Violeta.

5.6. NPs portadoras el *locus* completo del gen FXN

Una terapia génica óptima para la AF sería aquella en la que se consiguiesen revertir los niveles anómalos de frataxina y se alcanzasen los valores fisiológicos de proteína que presentan los individuos sanos. Las terapias basadas en el cDNA del gen FXN estarían obviando todas aquellas regiones intergénicas e intrónicas que puedan estar teniendo un papel importante en la regulación del gen y en la generación de las distintas isoformas de la frataxina (ver Resultados 1. y 2., respectivamente). Esto podría generar unos valores anómalos de frataxina, pudiéndose alcanzar incluso niveles que resultasen tóxicos.

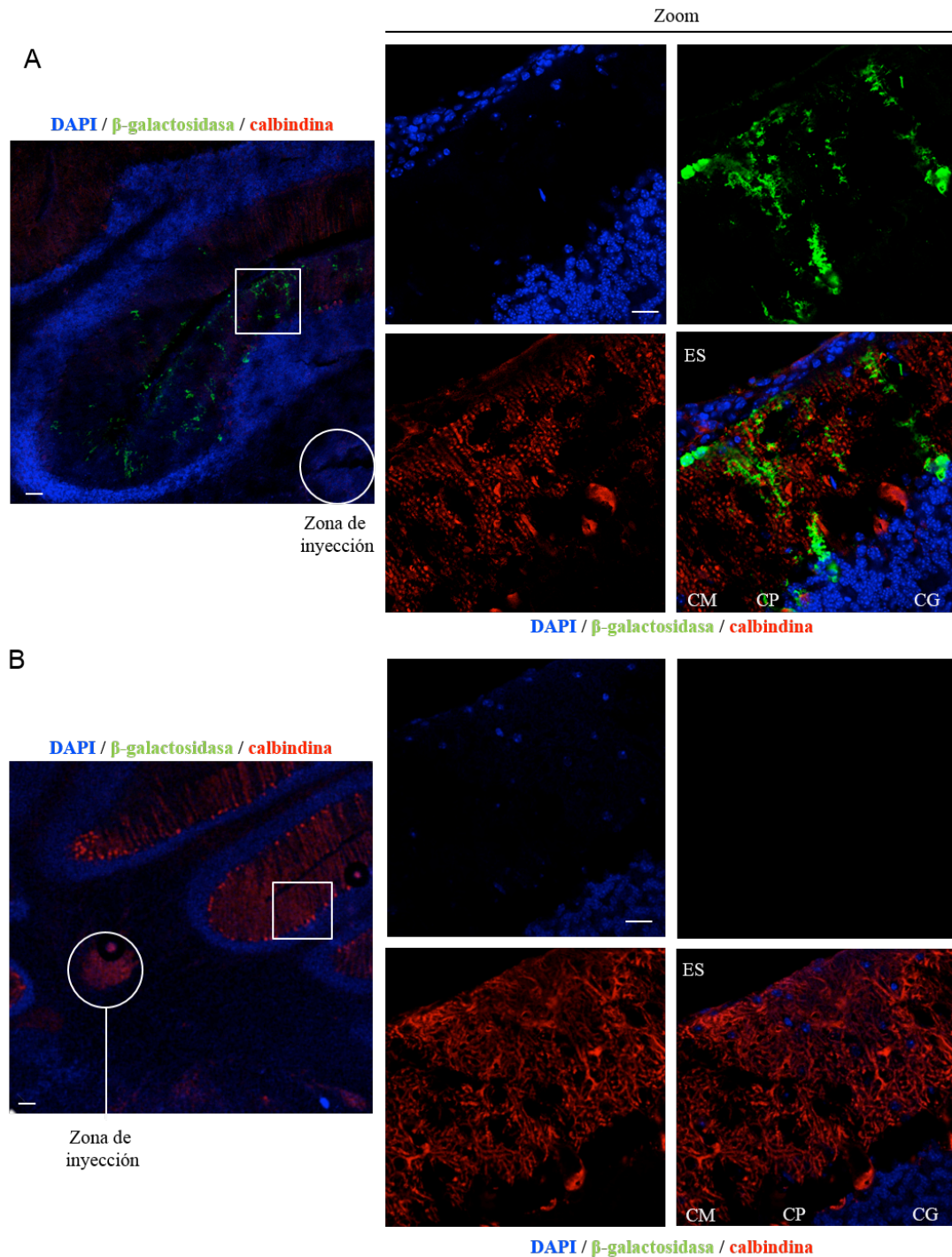


Figura 26. Ensayos *in vivo* con NPs funcionalizadas: Tinciones inmunohistoquímicas. Se inyectaron 10 μ L de las NPs funcionalizadas a una concentración 3X en los núcleos profundos del cerebelo (DCN, *Deep Cerebellar Nuclei*). Estas NPs portaban un plásmido con el gen de la β -galactosidasa. Tras 72 horas, los cerebelos fueron extraídos y se realizaron tinciones inmunohistoquímicas contra calbindina (proteína de unión al calcio, la cual está presente en las células de Purkinje; rojo), β -galactosidasa (proteína expresada por el plásmido que portan las NPs y los vectores HSV-1; verde) y DAPI (núcleos celulares; azul). **A.** Inyecciones intracraneales con vectores HSV-1. Las tinciones inmunohistoquímicas permitieron determinar que las células marcadas a nivel de la capa de células de Purkinje no son este tipo celular (no se observa co-localización) sino células de Bergmann (presenta además una morfología celular distinta). El soma de estas últimas también se encuentra en esta capa y sus ramificaciones se extienden por la capa molecular hasta el espacio subaracnoideo. **B.** Inyecciones intracraneales con NPs funcionalizadas. No se observó tinción contra β -galactosidasa, no pudiéndose determinar el tipo celular las NPs se internalizan. Abreviaturas: CG, Capa Granular; CM, Capa Molecular; CP, Capa de células de Purkinje; ES, Espacio Subaracnoideo.

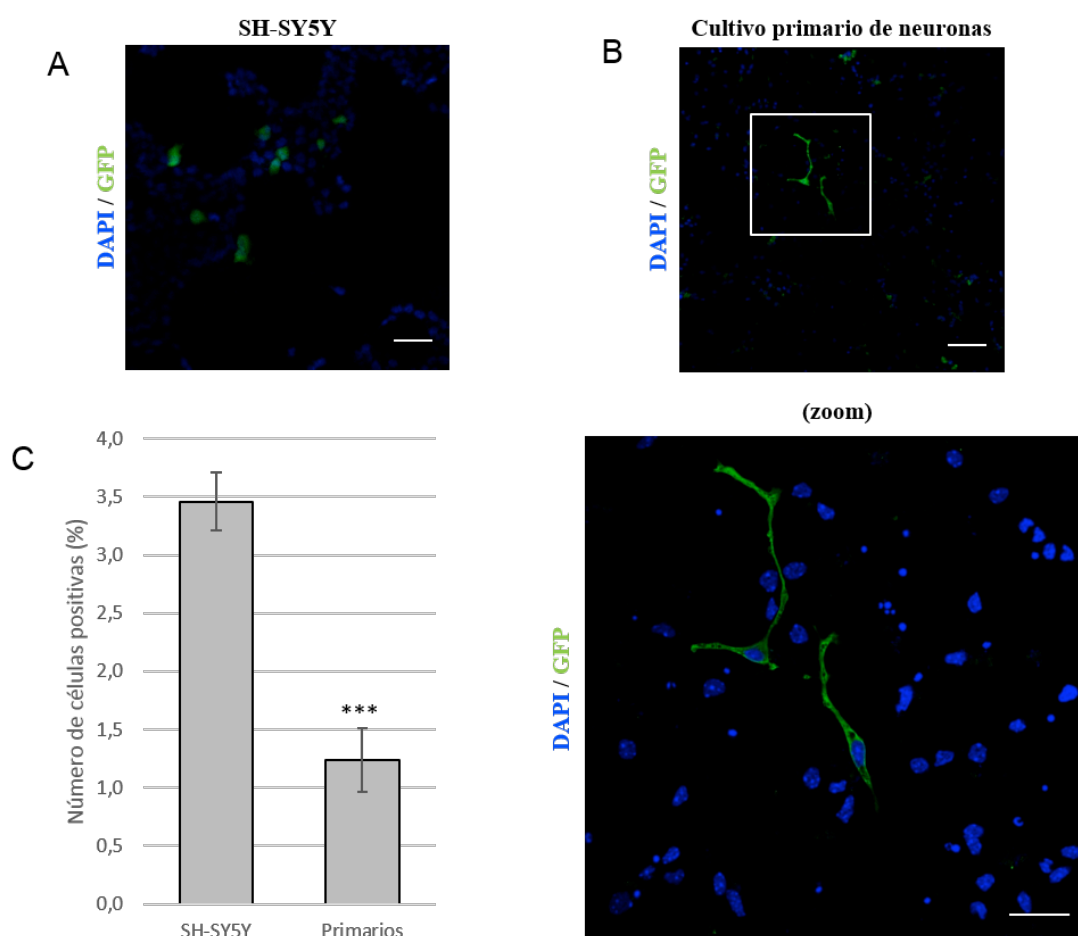


Figura 27: Ensayos *in vitro* con NPs portadoras el *locus* genómico de la frataxina. Las NPs utilizadas llevaban encapsulado el BAC-FXN, el cual lleva también como gen reportero la GFP (*Green Fluorescent Protein*). Los cultivos primarios de neuronas de la corteza cerebral se obtuvieron de embriones de 18 días (E18) de ratones C57BL/6. Las células fueron cultivadas según un protocolo descrito previamente (ver Materiales y Métodos). Fotografías con un microscopio de fluorescencia de las muestras teñidas contra GFP (verde) y DAPI (núcleos celulares, azul). Escala 20 μm y 5 μm (zoom) **A.** Ensayos en cultivos SH-SY5Y. **B.** Ensayos en cultivos primarios de neuronas de corteza cerebral de ratón. En este caso se observan neuronas teñidas contra GFP, lo que indica que las NPs se internalizaron y que el BAC-FXN se está expresando también este tipo de cultivo primario. Abajo: zoom de la zona señalada en la fotografía superior. **C.** Eficiencia de las NPs en los dos tipos de cultivos. Se observó que el número de células positivas en los cultivos primarios de neuronas de ratón fue menor a las observadas en SH-SY5Y sin diferenciar.

Para evitar este problema, se generaron NPs con la formulación optimizada en los ensayos anteriores, pero en este caso encapsulando un gran plásmido con el *locus* genómico de la frataxina (BAC-FXN), por lo que incluiría todos los elementos reguladores del gen FXN. Un hecho relevante es que la caracterización físico-química mostró, no solo que las NPs podían encapsular un plásmido de gran tamaño, sino que además tenían un tamaño adecuado (100-200 nm). Para la realización de estos ensayos, se utilizó una concentración 0,5 X de la formulación optimizada y

fueron testadas en SH-SY5Y sin diferenciar y diferenciadas, además de en cultivos primarios de neuronas de la corteza cerebral de ratón. Las NPs se dejaron en contacto con las siembras celulares durante 1,5 horas, y pasadas 48 horas, se observó la señal emitida por la GFP (gen reportero) (Figura 27).

Los resultados mostraron que las NPs funcionaron en SH-SY5Y sin diferenciar (Figura 27A), y también en los cultivos primarios de neuronas de ratón (Figura 27 B), aunque con una eficiencia menor (Figura 27C). Este menor rendimiento también se observó en los ensayos con NPs portadoras del plásmido de la β -galactosidasa realizados con anterioridad.

Por tanto, las NPs de PLGA funcionalizadas con los péptidos rD-THR y r8 son capaces de encapsular un BAC con el *locus* genómico de FXN y expresarlo en cultivos primarios de neuronas. En el futuro, deberá de optimizarse la producción de estas NPs con el BAC-FXN para estudiar su efectividad *in vivo*.

DISCUSIÓN

1. Terapia génica con el *locus* genómico de la frataxina

La regulación de la expresión génica en mamíferos es un proceso complejo y estrictamente regulado en el que están implicados muchos factores y niveles de control diferentes. Para un gen dado, las regiones no traducidas, incluyendo las regiones 5' y 3' UTR (*Untranslated Region*) y los intrones, son regiones importantes en la regulación de la expresión génica (Barrett et al., 2012). Del mismo modo, a pesar de haber sido consideradas durante muchos años como DNA "basura", se ha demostrado que las regiones intergénicas también contribuyen al control de la expresión génica (Noonan and McCallion, 2010, Carninci et al., 2005). De hecho, existe una relación directa entre la complejidad de los organismos superiores y el aumento del número y la complejidad de las vías reguladoras, coincidiendo también con el aumento del tamaño de las regiones no codificantes (Levine and Tjian, 2003).

Por este motivo, el uso de vectores de gran tamaño portadores de *locus* genómicos completos han recibido mayor atención en los últimos años como una alternativa a la terapia génica basada en cDNAs (Kouprina et al., 2014, Perez-Luz and Diaz-Nido, 2010). Estudios realizados en ratones transgénicos han demostrado los beneficios aportados por el uso de grandes fragmentos de DNA genómico, que permiten el suministro de genes de mamífero intactos con la inclusión de todos sus elementos reguladores, consiguiéndose de este modo un nivel y un control de la expresión comparable a la expresión endógena del gen (Pook et al., 2001, Sarsero et al., 2004, Sarsero et al., 2014).

En el caso concreto del gen de la frataxina, se han descrito en la zona del promotor la presencia de elementos con implicaciones en la regulación de gen, como por ejemplo elementos SINE (*Short Interspersed Nuclear Element*) pertenecientes a las subfamilias MIR, AluJb y AluY. También está descrita a 132 bases *downstream* del TSS1 una región que comparte secuencia con el elemento L2, cuya supresión afecta significativamente la expresión de FXN (Greene et al., 2005). En la región delimitada por el inicio del intrón 1 hasta el lugar donde se produce la expansión que causa la AF se encuentran intercalados tres elementos repetitivos: un elemento MIRb, un elemento MER1 (*primate-specific medium reiteration 1*), y parte de un elemento Alu, siendo este último a partir del cual deriva expansión de repeticiones (Greene et al., 2007).

Aunque la secuencia genética juega un papel esencial en la regulación de la expresión de los genes, los mecanismos epigenéticos desempeñan un papel importante en su modulación (Molina-Serrano et al., 2013). El DNA está envuelto alrededor de un octámero de proteínas que comprende dos copias de cada una de las histonas centrales: H2A, H2B, H3 y H4. Esta estructura dinámica se conoce como nucleosoma y es la unidad básica de la cromatina (Luger et al., 1997). Esta se

modula dinámicamente entre dos estados con el fin de regular la expresión génica: la eucromatina, que hace referencia a la forma descompactada de la cromatina y que puede estar activa o inactiva; y la heterocromatina, que se define como el estado condensado y silenciado de la cromatina. Estos estados pueden ser alterados por modificaciones post-transcripcionales (PTMs, *Post-translational Modifications*) en el DNA o las histonas, lo que afectará a la lectura de la secuencia de nucleótidos (Musselman et al., 2012). Concretamente, las histonas son susceptibles de sufrir diversos PTM incluyendo fosforilación, metilación, acetilación y ubiquitinación (Murr, 2010).

Debido a los escasos estudios epigenéticos realizados en el gen FXN y la relevancia que las regiones no codificantes tienen en la regulación genética, se decidió realizar un análisis bioinformático de distintas marcas epigenéticas de las histonas en el *locus* genómico completo de la frataxina. En este estudio se observó la existencia de zonas reguladoras a lo largo de toda su extensión, incluyendo regiones intergénicas e intrones. Una región interesante es la parte final del intrón 4 y la región *downstream* más cercana a FXN. En esta zona parece haber menos secuencias *enhancer* en una serie de tejidos en particular: cerebrales, musculares, pancreático y cardíaco. Teniendo en cuenta que el cerebro es uno de los órganos más afectados en la FA, y que los pacientes de esta enfermedad presentan atroñas musculares y cardíacas, y que también desarrollan diabetes, los resultados anteriores podrían sugerir una relación directa entre la menor presencia de regiones *enhancers* en estos tejidos y su predisposición a verse afectados en la AF. Por tanto, estos resultados sugieren que la regulación de la expresión de FXN puede ser específica de tejido, por lo que sería muy importante la utilización del *locus* genómico de la frataxina para obtener una regulación óptima de la expresión de dicho gen. Un hecho a tener en cuenta es que, en las bases de datos aportadas por los consorcios ENCODE y Roadmap (ENCODE, 2004, Kundaje et al., 2015) no se ofrecen datos de tejidos de gran interés en el estudio de la AF, como cerebelo, médula espinal y tejidos musculares motores. Además, para la validación de estos resultados sería necesaria la realización de ensayos biológicos.

El uso de cromosomas artificiales de levadura (YACs, *Yeast Artificial Chromosomes*) y de bacterias (BACs, *Bacterial Artificial Chromosomes*) han demostrado que los grandes fragmentos genómicos permiten la expresión específica de tejido a niveles fisiológicos (Taylor et al., 2014). Nuestro laboratorio también ha llevado a cabo diversos estudios de terapia génica de la AF utilizando vectores basados en el virus HSV-1. Se seleccionó este vector por su gran capacidad de almacenamiento, que permite empaquetar el *locus* completo del gen de la frataxina humana dentro de un BAC. Con esta aproximación, se observó una recuperación de los niveles de FXN y un rescate frente al estrés oxidativo en fibroblastos de pacientes de AF (Gomez-Sebastian et al., 2007a). Además, también se comprobó que el uso de este BAC permite la expresión a largo plazo de FXN *in vivo* (Gimenez-Cassina et al., 2011), además de revertir el déficit de coordinación motora causado por la ausencia de FXN al inyectar el vector herpesviral en la oliva inferior de

ratones (Lim et al., 2007). Por último, en nuestro laboratorio se ha utilizado también un vector herpesviral portador del gen del factor neurotrófico BDNF en ratones en los que se había inducido una deficiencia de FXN en el cerebelo. Se observó un rescate de los marcadores apoptóticos y de la atrofia de las células de Purkinje, además de una mejora en la coordinación motora (Katsu-Jimenez et al., 2016).

Por otro lado, las distintas funciones de la frataxina sigue siendo un tema de controversia. Se han descrito distintas formas de la proteína con diversas funciones específicas (Gakh et al., 2010, Schmucker et al., 2008), y recientemente también se han descrito tres isoformas del gen de la frataxina (Xia et al., 2012), con localizaciones celulares específicas para cada una de ellas. Durante el desarrollo de esta tesis se demostró que el vector BAC con el *locus* genómico de la frataxina (BAC-FXN) empaquetado en vectores HSV-1 fue capaz de producir todas las diferentes isoformas de la frataxina descritas, tanto *in vitro* en varios cultivos neurales, incluyendo células derivadas del paciente, como *in vivo* tras inyecciones en cerebelos de ratón.

Por tanto, este vector con el *locus* genómico de la frataxina es un candidato prometedor para la terapia génica al contener probablemente todos los elementos reguladores necesarios para la expresión fisiológica de la frataxina y la generación de las distintas isoformas.

2. Vectores HSV-1 modificados: una estrategia para la terapia génica de la AF por optimizar

La terapia génica ha tenido recientemente un éxito considerable en el tratamiento de enfermedades periféricas mediante el uso de vectores adenovirales (AAV) y lentivirales (LV), hasta el punto de que algunos de ellos han obtenido la autorización para su uso clínico en Europa (Glybera, EMA/670094/2015). Sin embargo, la terapia génica con vectores virales de enfermedades del sistema nervioso central ha tenido un progreso más moderado, aunque en los últimos años se han producido importantes avances (Choudhury et al., 2016).

Un factor determinante a tener en cuenta es la elección adecuada del vector utilizado para la entrega del gen terapéutico. De entre los distintos tipos de vectores virales utilizados actualmente, los HSV-1 poseen varias ventajas que les convierten en una herramienta interesante para la terapia génica del SNC. Por ejemplo, una característica importante es su gran capacidad de almacenamiento, siendo capaces de transportar y entregar hasta 150 kb de DNA exógeno (Jerusalinsky et al., 2012). Esta capacidad dista mucho de la del resto de vectores virales utilizados normalmente en terapia génica: hasta 4 kb los adeno-asociados, 10 kb los lentivirales y 30 kb los adenovirales (Lukashev and Zamyatnin, 2016). Otra ventaja son los bajos niveles de respuesta

inmune adaptativa que generan los vectores HSV-1, mientras que otros vectores presentan una inmunogenicidad más elevada, como es el caso de los vectores adenovirales (Hendrickx et al., 2014). Por otro lado, dado que el genoma viral de los vectores herpesvirales no se integra en los cromosomas celulares, existe una probabilidad muy baja de que se produzca mutagénesis insercional, un mecanismo que si tiene lugar con los vectores retrovirales (Hacein-Bey-Abina et al., 2003). Por último, y dado que nuestro objetivo es desarrollar una estrategia terapia génica en el SNC, una ventaja interesante que presentan los vectores HSV-1 es su amplio tropismo celular, transduciendo principalmente neuronas y células epiteliales, aunque también otros tipos como las células gliales (Chiocca et al., 1990). Además, también son capaces de realizar un transporte retrógrado y anterógrado en células neuronales (Diefenbach et al., 2008).

A estas ventajas hay que añadir varios avances tecnológicos que han favorecido la aplicación de los vectores HSV-1 en ensayos experimentales de terapia génica: la posibilidad de producir grandes cantidades de vectores herpesvirales sin la ayuda de un virus asistente (Saeki et al., 2001) y el desarrollo de su capacidad para entregar fragmentos muy grandes de DNA exógeno (Wade-Martins et al., 2001). Para ello, se han desarrollado distintos tipos de vectores herpesvirales para su uso en terapia génica:

- Vectores recombinantes incompatibles con la replicación (o replicación defectuosa): son herramientas no tóxicas que preservan la mayoría de las características neurotrópicas de los HSV-1, particularmente la capacidad de expresar genes después de establecer una infección latente (Manservigi et al., 2010, Verlengia et al., 2017). Se empezó un ensayo clínico con el vector NP-2 (Diamyd) para el tratamiento del dolor en pacientes de cáncer que alcanzó la Fase II. Aunque posteriormente fue cancelado por no alcanzar el objetivo principal de reducir el dolor en estos pacientes, si sirvió para comprobar la seguridad de este tipo de vectores.
- Vectores atenuados competentes para la replicación (oncolíticos): se están convirtiendo en construcciones eficaces para erradicar tumores cerebrales debido a su capacidad de replicarse y propagarse únicamente dentro de la masa tumoral (Marconi et al., 2010). Algunos ejemplos son G-207 y HSV-1716 (Crusade Laboratories), los cuales continúan actualmente utilizándose en distintos tipos de ensayos clínicos para el tratamiento de tumores cerebrales (ClinicalTrials.gov).
- Vectores amplicones: este tipo de vectores no lleva ningún tipo de gen herpesviral, lo que permite utilizar la capacidad máxima del HSV-1 y acomodar hasta 150 kb de DNA exógeno (Agudo et al., 2002). Por tanto, estos vectores permiten entregar *loci* genómicos completos al núcleo de células de mamífero, haciendo que esta herramienta sea particularmente útil en aquellos protocolos que requieren de una expresión transgénica estable y fisiológica

(Gimenez-Cassina et al., 2007). Sin embargo, las dificultades para obtener grandes cantidades de amplicones sin utilizar el método del “virus asistente” continúan limitando el uso de estos vectores en la clínica.

Como ya se comentó anteriormente, en nuestro laboratorio se realizaron ensayos con amplicones HSV-1 con el *locus* genómico completo de la frataxina (BAC-FXN). Estos fueron testados en fibroblastos provenientes de pacientes de AF deficientes de frataxina (Gomez-Sebastian et al., 2007b), observándose una recuperación de los niveles de FXN en este tipo de células. Posteriormente, también se realizaron ensayos *in vivo* consistentes en la inyección directa intracraneal de estos vectores con el BAC-FXN en el cerebelo de ratones adultos, revertiéndose el déficit de coordinación motora causado por la ausencia de FXN (Gimenez-Cassina et al., 2011). Este estudio también demostró por primera vez la posibilidad de alcanzar una expresión transgénica sostenida *in vivo* utilizando vectores HSV-1 portadores de un *locus* genómico de gran tamaño.

Una terapia génica ideal para la AF sería aquella en la que la administración del vector se produjese una única vez y con la menor intervención quirúrgica posible. Además, debido a que la frataxina es una proteína ubicua, la vía de administración elegida debería permitir una distribución amplia por todo el organismo y, especialmente, alcanzar las zonas más afectadas por la AF. Por todas estas razones, la inyección intravenosa se postula como la vía de administración mas adecuada. Sin embargo, los HSV-1 presentan un gran inconveniente: no son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), limitación importante teniendo en cuenta que el SNC es uno de los más afectados en AF.

Este obstáculo no solo afecta a los vectores HSV-1, si no que la gran mayoría de fármacos no pueden atravesar la BHE. Para salvar este obstáculo, los receptores y transportadores presentes en el lado luminal de la BHE han sido ampliamente utilizados como ruta de entrada al SNC, probándose la capacidad de suministrar diversos fármacos mediante ligandos naturales, tales como azúcares o proteínas, y anticuerpos contra receptores (Sanchez-Navarro et al., 2017). En los últimos años, ha ido adquiriendo importancia el uso de péptidos como lanzaderas para atravesar la BHE (Oller-Salvia et al., 2016). Un ejemplo claro es Angiopep-2, un péptido que interactúa con LDR-1 y actualmente es utilizado en ensayos clínicos (Demeule et al., 2008). Este péptido se ha utilizado para el transporte de una amplia variedad de cargas que van desde pequeñas moléculas a complejas NPs (Wang et al., 2015). Otros ejemplos interesantes son el anticuerpo monoclonal contra Her-2 (Regina et al., 2015), y péptidos derivados de ApoE y ApoB, que interactúan con los receptores de LDL y son capaces de promover la transcitosis hacia el parénquima cerebral (Wang et al., 2013, Spencer et al., 2015). También el péptido RVG, el cual

deriva de la glicoproteína del virus de la rabia y tiene predilección por las neuronas (Liu et al., 2009).

Como hemos comentado anteriormente, estos péptidos pueden ser unidos a gran variedad de moléculas y partículas, por lo que nuestro laboratorio estableció una colaboración con el grupo del Prof. Ernest Giralt del IRB Barcelona para intentar modificar los vectores HSV-1 mediante la unión de un péptido lanzadera. Este grupo ha desarrollado y caracterizado un péptido, el rD-THR, el cual permite atravesar la BHE mediante transcitosis (Prades et al., 2015). Estos vectores herpesvirales modificados fueron testados *in vitro*, pero no fue posible realizar ensayos *in vivo* por el limitado rendimiento obtenido en el proceso de generación y por la pérdida de gran cantidad de título durante el proceso de modificación. En cuanto a la parte del proceso que se desarrollaba en nuestro laboratorio (generación de las partículas HSV-1), se realizaron varias mejoras para aumentar el título de los lotes. Durante el proceso de generación de los vectores virales se produce una gran muerte celular, debido tanto al estrés que causa la transfección de los DNAs exógenos, como al propio proceso de generación de vectores virales en sí (Bednarek et al., 2002). Por ello, una de las estrategias seguidas para aumentar la eficiencia del proceso consistió en la generación de una nueva línea celular estable para un gen anti-apoptótico. El gen escogido fue Bcl2, el cual está involucrado en la regulación de la muerte celular programada (Delbridge et al., 2016). La sobre-expresión de este gen permitió reducir los niveles de mortalidad en las células empaquetadoras, revirtiendo en una mejora de la eficiencia del proceso de generación de vectores HSV-1.

Otra de las estrategias utilizadas consistió en la suplementación del medio de crecimiento de las células empaquetadoras de los vectores HSV-1. Durante el proceso de generación, toda la maquinaria y metabolismo celular se utilizan para tal fin, lo que podría implicar una mayor demanda nutricional de las células empaquetadoras. Con el fin de proporcionarles todos los suplementos que pueden necesitar para un eficiente proceso de empaquetamiento, el medio de cultivo se enriqueció con cuatro complementos diferentes: aminoácidos, antioxidantes, poliaminas y glutatión reducido, lo cuales son utilizados en las principales vías más afectadas durante la generación de vectores virales (Rodrigues et al., 2013), y habiéndose obteniendo un aumento destacable del título.

El proceso de modificación de los vectores HSV-1 requería no solo de títulos elevados sino también de una alta concentración (volúmenes reducidos), por lo que además de optimizar las condiciones de cultivo de las células empaquetadoras, otra estrategia que fue aplicada fue la realización de empaquetamientos sucesivos (en algunos casos hasta 4) utilizando como medio de recolección los sobrenadantes obtenidos en el empaquetamiento anterior. Sin embargo, el aumento de la eficiencia en el proceso de generación de los vectores HSV-1 no fue tan elevada

como se esperaba, posiblemente debido a que los vectores herpesvirales se inactivaran o destruyeran al aplicar esta estrategia. La explicación a este hecho podría estar directamente relacionada con la técnica de resuspensión, que podría deberse, o bien a los continuos procesos de congelación/descongelación requeridos (ya que los lotes virales se conservan a -80°C), o bien a la abrasión sufrida durante la resuspensión utilizando el empaquetamiento anterior en un volumen tan pequeño. Ninguno de los motivos anteriores son excluyentes el uno del otro, pudiéndose deber a la combinación de ambos factores.

Por tanto, una mejora futura del proceso de generación podría basarse en evitar este proceso de resuspensión. Una estrategia podría consistir en aumentar el proceso de excreción de los vectores HSV-1 al sobrenadante celular, ya que en el laboratorio se contabilizó en 14/15 el título total generado que permanece en el interior de las células empaquetadoras, liberándose al medio celular únicamente 1/15 del total. Con anterioridad a este trabajo, en el laboratorio se seguía un protocolo que incluía una lisis celular para recuperar la mayor cantidad de vectores posible, pero mediante esta técnica se generaban muchas impurezas incompatibles con los niveles de pureza requeridos en el proceso de modificación de los vectores HSV-1.

Por otro lado, otra estrategia posible para mejorar el rendimiento del proceso de generación podría ser la integración en el genoma de las células empaquetadoras del BAC que contiene toda la información necesaria para generar los vectores HSV-1 (comúnmente denominado “BAC empaquetador”). Esto no ha sido posible en el pasado porque dicho BAC resultaba citotóxico, pero podría ser una estrategia factible utilizando la nueva línea celular VERO 2-2-Bcl2, la cual es más resistente a la citotoxicidad provocada por la generación de los vectores HSV-1. Conseguirlo aumentaría la eficiencia del proceso, ya que la transfección de este plásmido de gran tamaño es poco eficiente, lo que afecta al porcentaje de células con capacidad empaquetadora tras la triple transfección que se realiza en el protocolo actual.

3. Nanopartículas funcionalizadas: una posible alternativa para la terapia génica de la AF

Como hemos comentado anteriormente, el desarrollo de terapias para el tratamiento y la cura de enfermedades del sistema nervioso tiene que hacer frente a un gran reto: utilizar vectores capaces de pasar a través de la barrera hematoencefálica (BHE), un obstáculo insuperable para muchos fármacos prometedores. De hecho, está estimado que casi el 100% de los fármacos formados por moléculas grandes y más del 98% de conformados por moléculas pequeñas no atraviesan la BHE (Pardridge, 2005). Con la finalidad de superar este y otros obstáculos, los vectores basados en nanopartículas (NPs) han sufrido un gran desarrollo en los últimos años,

postulándose como una estrategia prometedora para la terapia de distintas enfermedades del sistema nervioso alternativa al uso de vectores virales (Vinogradov et al., 2002).

De entre la gran variedad de NPs que potencialmente se pueden utilizar como vehículos de entrega, una de las más prometedoras son las conformadas de poli-(ácido láctico-co-glicólico) o PLGA (Cai et al., 2016, Danhier et al., 2012). A pesar de que hoy en día aún no se están realizando ensayos clínicos con este tipo de nanopartículas (ClinicalTrials.gov), sí que han sido ya aprobadas para uso en humanos tanto por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EEUU (FDA) como por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) (Shive and Anderson, 1997). Una de las principales ventajas del polímero PLGA es que, una vez en el interior del organismo, se hidroliza en ácido láctico y glicólico, los cuales son metabolitos encontrados de forma natural en el cuerpo humano (Kumari et al., 2010). No obstante, también están descritos una serie de inconvenientes intrínsecos a este tipo de NPs: su carga superficial negativa hace que la internalización celular sea ineficaz, tienen un tiempo de circulación en sangre relativamente corto y no son capaces de atravesar la BHE (Sah et al., 2013). A pesar de estos inconvenientes, el auge de las NPs de PLGA como vectores no virales para la terapia génica radica en su facilidad para ser modificadas y poder otorgarles distintas características funcionales y de orientación (Danhier et al., 2012).

Un ejemplo de funcionalización es mediante el uso de péptidos lanzadera que permiten el paso a través de la BHE o la adición de péptidos que mejoren la internalización celular (CPPs; *Cell-Penetrating Peptides*). Los CPPs son una familia de péptidos que suelen comprender entre 5 y 30 aminoácidos y que son capaces de pasar a través de tejidos y membranas celulares mediante mecanismos dependientes de energía o también directamente sin interactuar con receptores específicos de membrana (Raucher and Ryu, 2015). Tal es el potencial clínico de los CPPs que varias compañías farmacéuticas ya los están utilizando en ensayos clínicos para la administración local y sistémica de diversas moléculas terapéuticas (Guidotti et al., 2017). Uno de los tipos de CPPs más utilizados actualmente son los péptidos catiónicos. Están conformados principalmente por cadenas cortas de residuos de lisina y arginina, aunque estos últimos favorecen más la captación celular (Tunnemann et al., 2008). Algunos ejemplos de péptidos catiónicos son los derivados de TAT, penetratina, DPV1047 (Vectocell1) y las poliargininas (como por ejemplo el péptido r8) (Guidotti et al., 2017).

Uno de los objetivos de este trabajo fue desarrollar un vector no viral eficaz para la terapia génica de la AF. Con este fin, continuamos colaborando con el grupo del Prof. Ernest Giralt del IRB Barcelona, el cual también posee una gran experiencia en el campo de las nanopartículas y su funcionalización. Se generaron distintos tipos de nanopartículas de PLGA funcionalizadas con el péptido rD-THR, el cual ya fue utilizado anteriormente para la modificación de los vectores

HSV-1, y con el péptido de penetración celular r8, que favorece la internalización de la NP (Takeuchi and Futaki, 2016). Además, también se incluyó en la formulación el polímero PEI (Polietilenimina), el cual favorece la encapsulación del DNA, la internalización celular y el escape endosomal (Sun and Zhang, 2010).

Las NPs generadas fueron testadas en distintos cultivos celulares, tales como cultivos de células similares a neuronas adultas humanas (SH-SY5Y diferenciadas) y cultivos primarios de neuronas de la corteza cerebral de ratón. Pudimos demostrar su funcionalidad *in vitro* y se determinó una formulación óptima: 3 mg/mL PLGA-péptido (rD-THR y/o r8), DNA:PEI 1:10. Además, estas NPs no solo fueron capaces de encapsular un plásmido con el cDNA de la frataxina (6,4 kb), sino que también se consiguió encapsular un BAC con el *locus* genómico de la frataxina (135 kb), comprobándose su expresión en cultivos primarios de neuronas de la corteza de ratón. La toxicidad observada a concentraciones de entre 0,5 y 1X probablemente se deba a la vulnerabilidad que presentan este tipo de cultivos de neuronas.

En los ensayos *in vivo* se realizaron inyecciones intracraneales en los núcleos profundos del cerebelo, una de las zonas más afectadas en la AF. Mediante estos ensayos se comprobó que las nanopartículas con la formulación optimizada *in vitro* eran capaces de distribuirse por amplias zonas del cerebelo a través del líquido cefalorraquídeo que ocupa el espacio subaracnoideo de las meninges, observándose la presencia de señal positiva en células localizadas en la piamadre, capa molecular y capa de células de Purkinje, aunque no se ha podido determinar a qué tipo celular pertenecen. Sin embargo, este patrón de distribución es equivalente al observado por el control positivo (vectores HSV-1), y dado que estos vectores no atraviesan la BHE y que también hemos comprobado que se unen a células gliales, todo apuntaría a que las células en las que las NPs se internalizaron no fueran tampoco neuronas sino mas bien células gliales, y que las NPs se hubieran internalizado a través de las ramificaciones que presentan estas últimas hasta el espacio subaracnoideo, que es por donde viajan las NPs. Un hecho destacable es que no se observaron señales apreciables de toxicidad en estos ensayos *in vivo*.

Según esta hipótesis, las NPs no habrían atravesando la capa de células endoteliales que conforma la piamadre, y dado que esta capa es menos restrictiva que la BHE, nos hace pensar que estas NPs no serían capaces de atravesar esta última. Estos resultados coincidirían con ensayos realizados en el IRB Barcelona en un modelo *in vitro* de BHE (Cecchelli et al., 2014), en las que la eficiencia de las NPs atravesando la BHE fue muy baja, aunque deben de tenerse en cuenta las limitaciones de este tipo de modelos celulares (Naik and Cucullo, 2012). Una causa podría ser que el péptido estuviera enmascarado dentro de la trama de polímeros que conforma la NP y que no se estuviese reconociendo e interaccionando eficientemente con los receptores de la transferrina. Una posible solución podría ser la utilización de un polímero espaciador entre el

PLGA y el péptido lanzadera como el PEG (polietilenglicol), el cual ya fue utilizado en la modificación de los vectores HSV-1 y está descrito que también mejora la eficiencia de entrega (Sun and Zhang, 2010). Esta estrategia está representada en la Figura 28.

Para corroborar esta hipótesis, serán necesarios nuevos ensayos *in vivo* mediante inyecciones intravenosas, aunque también sería conveniente testar paralelamente nuevas formulaciones de NPs que permitiesen solventar algunas de las limitaciones observadas durante este trabajo. Por ejemplo, en los ensayos *in vitro* en cultivos de SH-SY5Y diferenciadas fueron necesarias tinciones X-Gal Violeta más prolongadas para observar señal, y lo mismo sucedió con los ensayos *in vivo* en cerebelos de ratón. Este hecho puede deberse a varios motivos:

1. El número de plásmidos encapsulados en las NPs podría ser reducido. Este hecho no se ha podido determinar por la propia metodología de generación de las NPs, en las que pueden formarse incluso NPs sin material genético. De hecho, está descrito que en este tipo de NPs el DNA encapsulado es del orden del 0,1-1% respecto del total de la formulación (Sun and Zhang, 2010). Esto contrasta con los vectores HSV-1, que teniendo en cuenta el tamaño del plásmido de la β -galactosidasa utilizado (8,1 kb), podrían llevar incluso más de 10 copias del plásmido empaquetadas (capacidad de hasta 150 kb de DNA exógeno).
2. Por otro lado, podrían estar habiendo problemas de escape endosomal. Permanecer en el interior de las vesículas endosomales limita de manera significativa la eficiencia de entrega de DNA por la acción de las enzimas lisosómicas y el entorno ácido. A pesar de que la formulación optimizada incluye el polímero catiónico PEI y el péptido de penetración celular r8, los cuales favorecen el escape endosomal (Sun and Zhang, 2010, Takeuchi and Futaki, 2016), podría no estar actuando eficientemente.

El primero de los motivos es una característica intrínseca de la mayoría de las NPs, por lo que su solución dependerá del desarrollo de nuevos polímero y estrategias que permitan solventar este problema. Respecto al escape endosomal, podrían intentarse varias estrategias, como la utilización de un polímero catiónico alternativo, como el quitosan, el cual también ha sido utilizado para el desarrollo de NPs en combinación con el PLGA (Tahara et al., 2008). Por otro lado, también podrían testarse NPs que incluyeran otro tipo de polímeros y péptidos, como aquellos sensibles al pH, los cuales son protonados o degradados en ambientes ácidos (como el interior de los endosomas), facilitando el escape endosomal. Algunos ejemplos son el polímero PPAA (*Poly(propylacrylic Acid)*) (Convertine et al., 2009) o péptidos formados por residuos de lisina e histidina (Benns et al., 2000).

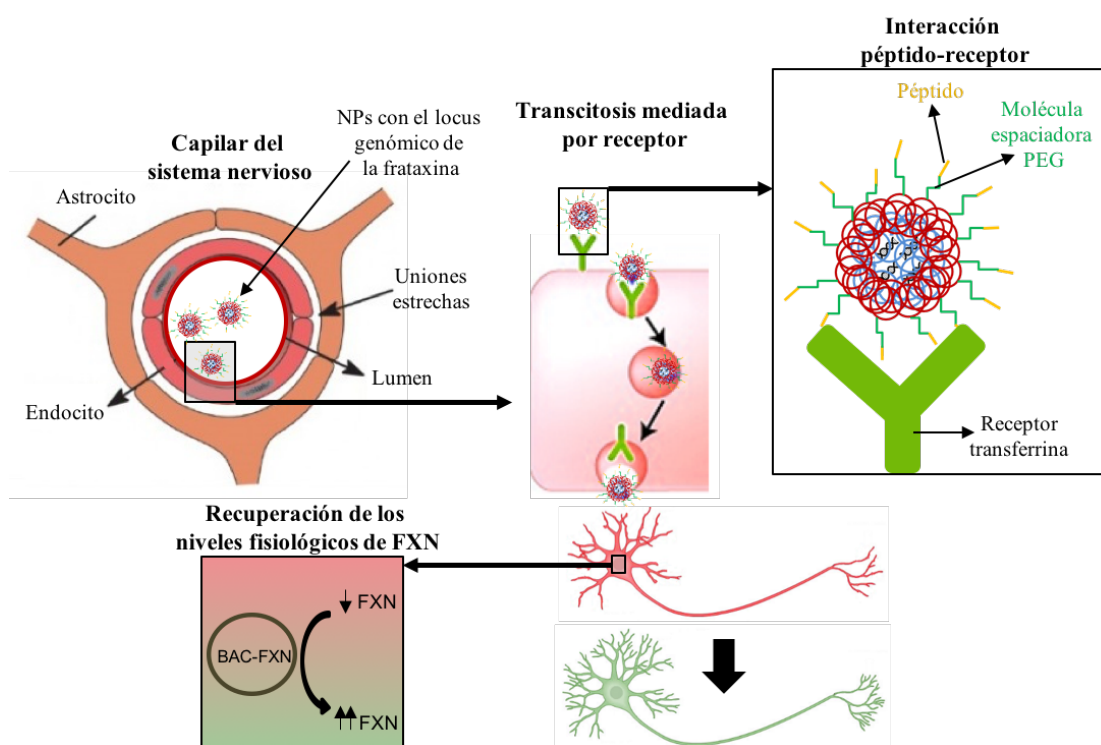


Figura 28. Propuesta de nanopartícula con la molécula espaciadora PEG. Al incluirse en la formulación de la NP la molécula espaciadora PEG (Polietilenglicol) entre el PLGA y el péptido, permitiría a este último estar más expuesto hacia el exterior de la NP y facilitaría su interacción con el receptor de la transferrina. Posteriormente, mediante una transcitosis mediada por receptor, la NP alcanzaría el parénquima cerebral y se internalizaría en las neuronas, donde liberaría el BAC con el *locus* genómico de la frataxina. Esto permitiría alcanzar unos niveles fisiológicos de la proteína al llevar todas las secuencias reguladoras, revirtiéndose los efectos causados por el déficit de frataxina, como la neurodegeneración.

Por último, para realizar futuros ensayos con inyecciones intravenosas, será necesario analizar la interacción de las NPs con los componentes de la sangre. Aunque la bioseguridad de las nanopartículas de PLGA está muy avalada (Semete et al., 2010, Shive and Anderson, 1997), las nanopartículas con cargas positivas sí que puedan ser tóxicas al activar la cascada de coagulación en sangre (Fornaguera et al., 2015). Este hecho es importante ya que las formulaciones utilizadas en este trabajo poseen polímeros y péptidos catiónicos (PEI y r8, respectivamente). Sin embargo, una ventaja de las NPs utilizadas en este trabajo es que el núcleo DNA-PEI está recubierto por el polímero PLGA, por lo que estos riesgos se ven reducidos. En caso de detectarse toxicidad, podrían utilizarse polímeros sensibles al pH, los cuales están descritos que son menos tóxicos que los catiónicos (Ma, 2014).

Concluyendo, la terapia génica de la AF basada en nanopartículas de PLGA funcionalizadas es una estrategia prometedora alternativa al uso de vectores virales, habiéndose comprobado su capacidad de encapsular un BAC con el *locus* genómico de la frataxina. Sin embargo, es necesaria una mayor optimización de la formulación para solventar las limitaciones observadas en este tipo

de NPs. El continuo avance en el campo de las nanopartículas permitirá con el tiempo el desarrollo de terapias génicas cada vez más eficaces, que en el futuro podrían convertirse en una alternativa factible en el tratamiento y curación de la ataxia de Friedreich.

CONCLUSIONES

1. El estudio bioinformático realizado sobre distintos marcadores epigenéticos muestra la existencia de posibles zonas regulatorias a lo largo de todo el *locus* genómico de la frataxina. Las regiones más destacadas son: el promotor, el final del intrón 4 y la zona *downstream* más cercana al gen, observándose patrones distintos entre determinados tejidos y células. Además, el final del intrón 4 y la zona *downstream* presentan una disminución de las marcas epigenéticas asociadas a zonas *enhancer* en los tejidos especialmente afectados en la ataxia de Friedreich.
2. El BAC con el *locus* genómico de la frataxina porta todos los elementos reguladores necesarios para la expresión de las distintas isoformas del gen, tanto la mitocondrial como las extra-mitocondriales, en ensayos *in vitro* e *in vivo*.
3. Se ha conseguido una mejora de la eficiencia del proceso de generación de los vectores HSV-1 siguiendo una estrategia combinada: la utilización de la línea celular VERO 2-2 establemente transfectada con el gen anti-apoptótico Bcl2 y la suplementación del medio de crecimiento.
4. Es posible la modificación de los vectores HSV-1 mediante la unión de péptidos lanzadera que permiten atravesar la barrera hematoencefálica. Sin embargo, ha sido insuficiente y es necesaria la optimización de las técnicas de generación y modificación de los vectores para poder continuar con la caracterización biológica en ensayos *in vivo*.
5. Las nanopartículas de polímero PLGA funcionalizadas con los péptidos rD-THR y r8 son capaces de internalizar y expresar el gen encapsulado tanto en cultivos de células neurales como en cerebelos de ratón. Las inyecciones directas en los núcleos profundos del cerebelo muestran una amplia distribución a través del líquido cefalorraquídeo, alcanzando zonas de la capa granular y de la capa de células de Purkinje. Sin embargo, su eficiencia es limitada y es necesario optimizar su producción.
6. Las nanopartículas de PLGA funcionalizadas son capaces de encapsular DNAs de gran tamaño con el *locus* genómico de la frataxina, además de internalizarse y expresar el gen en cultivos primarios de neuronas de la corteza cerebral de ratón, quedando por demostrar su eficiencia *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

- ADAMEC, J., RUSNAK, F., OWEN, W. G., NAYLOR, S., BENSON, L. M., GACY, A. M. & ISAYA, G. 2000. Iron-dependent self-assembly of recombinant yeast frataxin: implications for Friedreich ataxia. *Am J Hum Genet*, 67, 549-62.
- AGUDO, M., TREJO, J. L., LIM, F., AVILA, J., TORRES-ALEMAN, I., DIAZ-NIDO, J. & WANDOSELL, F. 2002. Highly efficient and specific gene transfer to Purkinje cells in vivo using a herpes simplex virus I amplicon. *Hum Gene Ther*, 13, 665-74.
- AKHLAGHI, H., CORBEN, L., GEORGIU-KARISTIANIS, N., BRADSHAW, J., STOREY, E., DELATYCKI, M. B. & EGAN, G. F. 2011. Superior cerebellar peduncle atrophy in Friedreich's ataxia correlates with disease symptoms. *Cerebellum*, 10, 81-7.
- AL-MAHDAWI, S., PINTO, R. M., ISMAIL, O., VARSHNEY, D., LYMPERI, S., SANDI, C., TRABZUNI, D. & POOK, M. 2008. The Friedreich ataxia GAA repeat expansion mutation induces comparable epigenetic changes in human and transgenic mouse brain and heart tissues. *Hum Mol Genet*, 17, 735-46.
- AL-MAHDAWI, S., PINTO, R. M., VARSHNEY, D., LAWRENCE, L., LOWRIE, M. B., HUGHES, S., WEBSTER, Z., BLAKE, J., COOPER, J. M., KING, R. & POOK, M. A. 2006. GAA repeat expansion mutation mouse models of Friedreich ataxia exhibit oxidative stress leading to progressive neuronal and cardiac pathology. *Genomics*, 88, 580-90.
- BALAKRISHNAN, L. & MILAVETZ, B. 2010. Decoding the histone H4 lysine 20 methylation mark. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 45, 440-52.
- BANKS, W. A., ROBINSON, S. M., WOLF, K. M., BESS, J. W., JR. & ARTHUR, L. O. 2004. Binding, internalization, and membrane incorporation of human immunodeficiency virus-1 at the blood-brain barrier is differentially regulated. *Neuroscience*, 128, 143-53.
- BANNISTER, A. J. & KOUZARIDES, T. 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*, 21, 381-95.
- BARRETT, L. W., FLETCHER, S. & WILTON, S. D. 2012. Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cell Mol Life Sci*, 69, 3613-34.
- BARSKI, A., CUDDAPAH, S., CUI, K., ROH, T. Y., SCHONES, D. E., WANG, Z., WEI, G., CHEPELEV, I. & ZHAO, K. 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 129, 823-37.
- BARTLETT, W. P. & BANKER, G. A. 1984. An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. I. Cells which develop without intercellular contacts. *J Neurosci*, 4, 1944-53.
- BARTUS, R. T., WEINBERG, M. S. & SAMULSKI, R. J. 2014. Parkinson's disease gene therapy: success by design meets failure by efficacy. *Mol Ther*, 22, 487-97.
- BASHKIROV, V. N. 2002. [The origin of heterochromatin in eukaryotes]. *Genetika*, 38, 789-92.
- BAYOT, A., SANTOS, R., CAMADRO, J. M. & RUSTIN, P. 2011. Friedreich's ataxia: the vicious circle hypothesis revisited. *BMC Med*, 9, 112.
- BEDNAREK, I., CZAJKA, M. & WILCZOK, T. 2002. Efficiency of lipofection of adherent cells is limited by apoptosis. *Folia Histochem Cytobiol*, 40, 133-4.
- BENCZE, K. Z., YOON, T., MILLAN-PACHECO, C., BRADLEY, P. B., PASTOR, N., COWAN, J. A. & STEMMER, T. L. 2007. Human frataxin: iron and ferrochelatase binding surface. *Chem Commun (Camb)*, 1798-800.

- BENNS, J. M., CHOI, J. S., MAHATO, R. I., PARK, J. S. & KIM, S. W. 2000. pH-sensitive cationic polymer gene delivery vehicle: N-Ac-poly(L-histidine)-graft-poly(L-lysine) comb shaped polymer. *Bioconjug Chem*, 11, 637-45.
- BERGES, B. K., WOLFE, J. H. & FRASER, N. W. 2007. Transduction of brain by herpes simplex virus vectors. *Mol Ther*, 15, 20-9.
- BULTEAU, A. L., O'NEILL, H. A., KENNEDY, M. C., IKEDA-SAITO, M., ISAYA, G. & SZWEDA, L. I. 2004. Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. *Science*, 305, 242-5.
- BURK, K. 2017. Friedreich Ataxia: current status and future prospects. *Cerebellum Ataxias*, 4, 4.
- BUSHEY, A. M., DORMAN, E. R. & CORCES, V. G. 2008. Chromatin insulators: regulatory mechanisms and epigenetic inheritance. *Mol Cell*, 32, 1-9.
- CAI, Q., WANG, L., DENG, G., LIU, J., CHEN, Q. & CHEN, Z. 2016. Systemic delivery to central nervous system by engineered PLGA nanoparticles. *Am J Transl Res*, 8, 749-64.
- CAMPUZANO, V., MONTERMINI, L., LUTZ, Y., COVA, L., HINDELANG, C., JIRALERSPONG, S., TROTTIER, Y., KISH, S. J., FAUCHEUX, B., TROUILLAS, P., AUTHIER, F. J., DURR, A., MANDEL, J. L., VESCOVI, A., PANDOLFO, M. & KOENIG, M. 1997. Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum Mol Genet*, 6, 1771-80.
- CAMPUZANO, V., MONTERMINI, L., MOLTO, M. D., PIANESE, L., COSSEE, M., CAVALCANTI, F., MONROS, E., RODIUS, F., DUCLOS, F., MONTICELLI, A., ZARA, F., CANIZARES, J., KOUTNIKOVA, H., BIDICHANDANI, S. I., GELLERA, C., BRICE, A., TROUILLAS, P., DE MICHELE, G., FILLA, A., DE FRUTOS, R., PALAU, F., PATEL, P. I., DI DONATO, S., MANDEL, J. L., COCOZZA, S., KOENIG, M. & PANDOLFO, M. 1996. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science*, 271, 1423-7.
- CARNINCI, P., KASUKAWA, T., KATAYAMA, S., GOUGH, J., FRITH, M. C., MAEDA, N., OYAMA, R., RAVASI, T., LENHARD, B., WELLS, C., KODZIUS, R., SHIMOKAWA, K., BAJIC, V. B., BRENNER, S. E., BATALOV, S., FORREST, A. R., ZAVOLAN, M., DAVIS, M. J., WILMING, L. G., AIDINIS, V., ALLEN, J. E., AMBESI-IMPIOMBATO, A., APWEILER, R., ATURALIYA, R. N., BAILEY, T. L., BANSAL, M., BAXTER, L., BEISEL, K. W., BERSANO, T., BONO, H., CHALK, A. M., CHIU, K. P., CHOUDHARY, V., CHRISTOFFELS, A., CLUTTERBUCK, D. R., CROWE, M. L., DALLA, E., DALRYMPLE, B. P., DE BONO, B., DELLA GATTA, G., DI BERNARDO, D., DOWN, T., ENGSTROM, P., FAGIOLINI, M., FAULKNER, G., FLETCHER, C. F., FUKUSHIMA, T., FURUNO, M., FUTAKI, S., GARIBOLDI, M., GEORGII-HEMMING, P., GINGERAS, T. R., GOJOBORI, T., GREEN, R. E., GUSTINCICH, S., HARBERS, M., HAYASHI, Y., HENSCH, T. K., HIROKAWA, N., HILL, D., HUMINIECKI, L., IACONO, M., IKEO, K., IWAMA, A., ISHIKAWA, T., JAKT, M., KANAPIN, A., KATOH, M., KAWASAWA, Y., KELSO, J., KITAMURA, H., KITANO, H., KOLLIAS, G., KRISHNAN, S. P., KRUGER, A., KUMMERFELD, S. K., KUROCHKIN, I. V., LAREAU, L. F., LAZAREVIC, D., LIPOVICH, L., LIU, J., LIUNI, S., MCWILLIAM, S., MADAN BABU, M., MADERA, M., MARCHIONNI, L., MATSUDA, H., MATSUZAWA, S., MIKI, H., MIGNONE, F., MIYAKE, S., MORRIS, K., MOTTAGUI-TABAR, S., MULDER, N., NAKANO, N.,

- NAKAUCHI, H., NG, P., NILSSON, R., NISHIGUCHI, S., NISHIKAWA, S., et al. 2005. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science*, 309, 1559-63.
- CAVADINI, P., ADAMEC, J., TARONI, F., GAKH, O. & ISAYA, G. 2000. Two-step processing of human frataxin by mitochondrial processing peptidase. Precursor and intermediate forms are cleaved at different rates. *J Biol Chem*, 275, 41469-75.
- CECCHELLI, R., ADAY, S., SEVIN, E., ALMEIDA, C., CULOT, M., DEHOUC, L., COISNE, C., ENGELHARDT, B., DEHOUC, M. P. & FERREIRA, L. 2014. A stable and reproducible human blood-brain barrier model derived from hematopoietic stem cells. *PLoS One*, 9, e99733.
- CNOP, M., MULDER, H. & IGOILLO-ESTEVE, M. 2013. Diabetes in Friedreich ataxia. *J Neurochem*, 126 Suppl 1, 94-102.
- COLIN, F., MARTELLI, A., CLEMANCEY, M., LATOUR, J. M., GAMBARELLI, S., ZEPPIERI, L., BIRCK, C., PAGE, A., PUCCIO, H. & OLLAGNIER DE CHOUDENS, S. 2013. Mammalian frataxin controls sulfur production and iron entry during de novo Fe4S4 cluster assembly. *J Am Chem Soc*, 135, 733-40.
- COLLINS, M. & THRASHER, A. 2015. Gene therapy: progress and predictions. *Proc Biol Sci*, 282, 20143003.
- CONVERTINE, A. J., BENOIT, D. S., DUVALL, C. L., HOFFMAN, A. S. & STAYTON, P. S. 2009. Development of a novel endosomolytic diblock copolymer for siRNA delivery. *J Control Release*, 133, 221-9.
- COSSEE, M., PUCCIO, H., GANSMULLER, A., KOUTNIKOVA, H., DIERICH, A., LEMEUR, M., FISCHBECK, K., DOLLE, P. & KOENIG, M. 2000. Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum Mol Genet*, 9, 1219-26.
- CHAN, P. K., TORRES, R., YANDIM, C., LAW, P. P., KHADAYATE, S., MAURI, M., GROSAN, C., CHAPMAN-ROTHER, N., GIUNTI, P., POOK, M. & FESTENSTEIN, R. 2013. Heterochromatinization induced by GAA-repeat hyperexpansion in Friedreich's ataxia can be reduced upon HDAC inhibition by vitamin B3. *Hum Mol Genet*, 22, 2662-75.
- CHIOCCA, E. A., CHOI, B. B., CAI, W. Z., DELUCA, N. A., SCHAFFER, P. A., DIFIGLIA, M., BREAKFIELD, X. O. & MARTUZA, R. L. 1990. Transfer and expression of the lacZ gene in rat brain neurons mediated by herpes simplex virus mutants. *New Biol*, 2, 739-46.
- CHOUDHURY, S. R., HUDRY, E., MAGUIRE, C. A., SENA-ESTEVES, M., BREAKFIELD, X. O. & GRANDI, P. 2016. Viral vectors for therapy of neurologic diseases. *Neuropharmacology*.
- DANHIER, F., ANSORENA, E., SILVA, J. M., COCO, R., LE BRETON, A. & PREAT, V. 2012. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Release*, 161, 505-22.
- DE BIASE, I., CHUTAKE, Y. K., RINDLER, P. M. & BIDICHANDANI, S. I. 2009. Epigenetic silencing in Friedreich ataxia is associated with depletion of CTCF (CCCTC-binding factor) and antisense transcription. *PLoS One*, 4, e7914.
- DE MICHELE, G., PERRONE, F., FILLA, A., MIRANTE, E., GIORDANO, M., DE PLACIDO, S. & CAMPANELLA, G. 1996. Age of onset, sex, and cardiomyopathy as predictors of disability and survival in Friedreich's disease: a retrospective study on 119 patients. *Neurology*, 47, 1260-4.

- DELBRIDGE, A. R., GRABOW, S., STRASSER, A. & VAUX, D. L. 2016. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nat Rev Cancer*, 16, 99-109.
- DEMEULE, M., REGINA, A., CHE, C., POIRIER, J., NGUYEN, T., GABATHULER, R., CASTAIGNE, J. P. & BELIVEAU, R. 2008. Identification and design of peptides as a new drug delivery system for the brain. *J Pharmacol Exp Ther*, 324, 1064-72.
- DIEFENBACH, R. J., MIRANDA-SAKSENA, M., DOUGLAS, M. W. & CUNNINGHAM, A. L. 2008. Transport and egress of herpes simplex virus in neurons. *Rev Med Virol*, 18, 35-51.
- ENCINAS, M., IGLESIAS, M., LIU, Y., WANG, H., MUHAISEN, A., CENA, V., GALLEGU, C. & COMELLA, J. X. 2000. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem*, 75, 991-1003.
- ENCODE 2004. The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project. *Science*, 306, 636-40.
- ERNST, J. & KELLIS, M. 2010. Discovery and characterization of chromatin states for systematic annotation of the human genome. *Nat Biotechnol*, 28, 817-25.
- ERNST, J. & KELLIS, M. 2012. ChromHMM: automating chromatin-state discovery and characterization. *Nat Methods*, 9, 215-6.
- ERNST, J., KHERADPOUR, P., MIKKELSEN, T. S., SHORESH, N., WARD, L. D., EPSTEIN, C. B., ZHANG, X., WANG, L., ISSNER, R., COYNE, M., KU, M., DURHAM, T., KELLIS, M. & BERNSTEIN, B. E. 2011. Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature*, 473, 43-9.
- ESCORS, D. & BRECKPOT, K. 2010. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 58, 107-19.
- ESPINOS-ARMERO, C., GONZALEZ-CABO, P. & PALAU-MARTINEZ, F. 2005. [Autosomal recessive cerebellar ataxias. Their classification, genetic features and pathophysiology]. *Rev Neurol*, 41, 409-22.
- EVANS-GALEA, M. V., CARRODUS, N., ROWLEY, S. M., CORBEN, L. A., TAI, G., SAFFERY, R., GALATI, J. C., WONG, N. C., CRAIG, J. M., LYNCH, D. R., REGNER, S. R., BROCHT, A. F., PERLMAN, S. L., BUSHARA, K. O., GOMEZ, C. M., WILMOT, G. R., LI, L., VARLEY, E., DELATYCKI, M. B. & SARSERO, J. P. 2012. FXN methylation predicts expression and clinical outcome in Friedreich ataxia. *Ann Neurol*, 71, 487-97.
- EZZATIZADEH, V., PINTO, R. M., SANDI, C., SANDI, M., AL-MAHDAWI, S., TE RIELE, H. & POOK, M. A. 2012. The mismatch repair system protects against intergenerational GAA repeat instability in a Friedreich ataxia mouse model. *Neurobiol Dis*, 46, 165-71.
- FAGHIHI, M. A. & WAHLESTEDT, C. 2009. Regulatory roles of natural antisense transcripts. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 637-43.
- FINOCCHIARO, G., BAIU, G., MICOSSI, P., POZZA, G. & DI DONATO, S. 1988. Glucose metabolism alterations in Friedreich's ataxia. *Neurology*, 38, 1292-6.
- FLEMING, J., SPINOULAS, A., ZHENG, M., CUNNINGHAM, S. C., GINN, S. L., MCQUILTY, R. C., ROWE, P. B. & ALEXANDER, I. E. 2005. Partial correction of sensitivity to oxidant stress in Friedreich ataxia patient fibroblasts by frataxin-encoding adeno-associated virus and lentivirus vectors. *Hum Gene Ther*, 16, 947-56.

- FORNAGUERA, C., CALDERO, G., MITJANS, M., VINARDELL, M. P., SOLANS, C. & VAUTHIER, C. 2015. Interactions of PLGA nanoparticles with blood components: protein adsorption, coagulation, activation of the complement system and hemolysis studies. *Nanoscale*, 7, 6045-58.
- FOUST, K. D., NURRE, E., MONTGOMERY, C. L., HERNANDEZ, A., CHAN, C. M. & KASPAR, B. K. 2009. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat Biotechnol*, 27, 59-65.
- GAKH, O., BEDEKOVICS, T., DUNCAN, S. F., SMITH, D. Y. T., BERKHOLZ, D. S. & ISAYA, G. 2010. Normal and Friedreich ataxia cells express different isoforms of frataxin with complementary roles in iron-sulfur cluster assembly. *J Biol Chem*, 285, 38486-501.
- GAO, G., VANDENBERGHE, L. H. & WILSON, J. M. 2005. New recombinant serotypes of AAV vectors. *Curr Gene Ther*, 5, 285-97.
- GELLER, A. I. & BREAKFIELD, X. O. 1988. A defective HSV-1 vector expresses Escherichia coli beta-galactosidase in cultured peripheral neurons. *Science*, 241, 1667-9.
- GERARD, C., XIAO, X., FILALI, M., COULOMBE, Z., ARSENAULT, M., COUET, J., LI, J., DROLET, M. C., CHAPDELAINE, P., CHIKH, A. & TREMBLAY, J. P. 2014. An AAV9 coding for frataxin clearly improved the symptoms and prolonged the life of Friedreich ataxia mouse models. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 1, 14044.
- GIMENEZ-CASSINA, A., LIM, F. & DIAZ-NIDO, J. 2006. Differentiation of a human neuroblastoma into neuron-like cells increases their susceptibility to transduction by herpesviral vectors. *J Neurosci Res*, 84, 755-67.
- GIMENEZ-CASSINA, A., LIM, F. & DIAZ-NIDO, J. 2007. Gene transfer into Purkinje cells using herpesviral amplicon vectors in cerebellar cultures. *Neurochem Int*, 50, 181-8.
- GIMENEZ-CASSINA, A., WADE-MARTINS, R., GOMEZ-SEBASTIAN, S., CORONA, J. C., LIM, F. & DIAZ-NIDO, J. 2011. Infectious delivery and long-term persistence of transgene expression in the brain by a 135-kb iBAC-FXN genomic DNA expression vector. *Gene Ther*, 18, 1015-9.
- GOMEZ-SEBASTIAN, S., GIMENEZ-CASSINA, A., DIAZ-NIDO, J., LIM, F. & WADE-MARTINS, R. 2007a. Infectious Delivery and Expression of a 135 kb Human FRDA Genomic DNA Locus Complements Friedreich's Ataxia Deficiency in Human Cells. *Mol Ther*, 15, 248-254.
- GOMEZ-SEBASTIAN, S., GIMENEZ-CASSINA, A., DIAZ-NIDO, J., LIM, F. & WADE-MARTINS, R. 2007b. Infectious delivery and expression of a 135 kb human FRDA genomic DNA locus complements Friedreich's ataxia deficiency in human cells. *Mol Ther*, 15, 248-54.
- GONZALEZ-CABO, P., VAZQUEZ-MANRIQUE, R. P., GARCIA-GIMENO, M. A., SANZ, P. & PALAU, F. 2005. Frataxin interacts functionally with mitochondrial electron transport chain proteins. *Hum Mol Genet*, 14, 2091-8.
- GRAMEGNA, L. L., TONON, C., MANNERS, D. N., PINI, A., RINALDI, R., ZANIGNI, S., BIANCHINI, C., EVANGELISTI, S., FORTUNA, F., CARELLI, V., TESTA, C. & LODI, R. 2017. Combined Cerebellar Proton MR Spectroscopy and DWI Study of Patients with Friedreich's Ataxia. *Cerebellum*, 16, 82-88.

- GRAY, S. J., NAGABHUSHAN KALBURGI, S., MCCOWN, T. J. & JUDE SAMULSKI, R. 2013. Global CNS gene delivery and evasion of anti-AAV-neutralizing antibodies by intrathecal AAV administration in non-human primates. *Gene Ther*, 20, 450-9.
- GREENE, E., ENTEZAM, A., KUMARI, D. & USDIN, K. 2005. Ancient repeated DNA elements and the regulation of the human frataxin promoter. *Genomics*, 85, 221-30.
- GREENE, E., MAHISHI, L., ENTEZAM, A., KUMARI, D. & USDIN, K. 2007. Repeat-induced epigenetic changes in intron 1 of the frataxin gene and its consequences in Friedreich ataxia. *Nucleic Acids Res*, 35, 3383-90.
- GUIDOTTI, G., BRAMBILLA, L. & ROSSI, D. 2017. Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. *Trends Pharmacol Sci*, 38, 406-424.
- HACEIN-BEY-ABINA, S., GARRIGUE, A., WANG, G. P., SOULIER, J., LIM, A., MORILLON, E., CLAPPIER, E., CACCAVELLI, L., DELABESSE, E., BELDJORD, K., ASNAFI, V., MACINTYRE, E., DAL CORTIVO, L., RADFORD, I., BROUSSE, N., SIGAUX, F., MOSHOUS, D., HAUER, J., BORKHARDT, A., BELOHRADSKY, B. H., WINTERGERST, U., VELEZ, M. C., LEIVA, L., SORENSEN, R., WULFFRAAT, N., BLANCHE, S., BUSHMAN, F. D., FISCHER, A. & CAVAZZANA-CALVO, M. 2008. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest*, 118, 3132-42.
- HACEIN-BEY-ABINA, S., VON KALLE, C., SCHMIDT, M., LE DEIST, F., WULFFRAAT, N., MCINTYRE, E., RADFORD, I., VILLEVAL, J. L., FRASER, C. C., CAVAZZANA-CALVO, M. & FISCHER, A. 2003. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*, 348, 255-6.
- HENDRICKX, R., STICHLING, N., KOELEN, J., KURYK, L., LIPIEC, A. & GREBER, U. F. 2014. Innate immunity to adenovirus. *Hum Gene Ther*, 25, 265-84.
- HOFFMAN, M. M., ERNST, J., WILDER, S. P., KUNDAJE, A., HARRIS, R. S., LIBBRECHT, M., GIARDINE, B., ELLENBOGEN, P. M., BILMES, J. A., BIRNEY, E., HARDISON, R. C., DUNHAM, I., KELLIS, M. & NOBLE, W. S. 2013. Integrative annotation of chromatin elements from ENCODE data. *Nucleic Acids Res*, 41, 827-41.
- JAYANT, R. D., SOSA, D., KAUSHIK, A., ATLURI, V., VASHIST, A., TOMITAKA, A. & NAIR, M. 2016. Current status of non-viral gene therapy for CNS disorders. *Expert Opin Drug Deliv*, 13, 1433-45.
- JERUSALINSKY, D., BAEZ, M. V. & EPSTEIN, A. L. 2012. Herpes simplex virus type 1-based amplicon vectors for fundamental research in neurosciences and gene therapy of neurological diseases. *J Physiol Paris*, 106, 2-11.
- JIANG, L., VADER, P. & SCHIFFELERS, R. M. 2017. Extracellular vesicles for nucleic acid delivery: progress and prospects for safe RNA-based gene therapy. *Gene Ther*, 24, 157-166.
- KATSU-JIMENEZ, Y., LORIA, F., CORONA, J. C. & DIAZ-NIDO, J. 2016. Gene Transfer of Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) Prevents Neurodegeneration Triggered by FXN Deficiency. *Mol Ther*, 24, 877-89.
- KHONSARI, H., SCHNEIDER, M., AL-MAHDAWI, S., CHIANEA, Y. G., THEMIS, M., PARRIS, C., POOK, M. A. & THEMIS, M. 2016. Lentivirus-mediated frataxin gene delivery reverses genome instability in Friedreich ataxia patient and mouse model fibroblasts. *Gene Ther*, 23, 846-856.

- KOEPPEN, A. H. 2011. Friedreich's ataxia: pathology, pathogenesis, and molecular genetics. *J Neurol Sci*, 303, 1-12.
- KOEPPEN, A. H. & MAZURKIEWICZ, J. E. 2013. Friedreich ataxia: neuropathology revised. *J Neuropathol Exp Neurol*, 72, 78-90.
- KOEPPEN, A. H., RAMIREZ, R. L., BECKER, A. B., BJORK, S. T., LEVI, S., SANTAMBROGIO, P., PARSONS, P. J., KRUGER, P. C., YANG, K. X., FEUSTEL, P. J. & MAZURKIEWICZ, J. E. 2015a. The pathogenesis of cardiomyopathy in Friedreich ataxia. *PLoS One*, 10, e0116396.
- KOEPPEN, A. H., RAMIREZ, R. L., BECKER, A. B., FEUSTEL, P. J. & MAZURKIEWICZ, J. E. 2015b. Friedreich ataxia: failure of GABA-ergic and glycinergic synaptic transmission in the dentate nucleus. *J Neuropathol Exp Neurol*, 74, 166-76.
- KOUPRINA, N., TOMILIN, A. N., MASUMOTO, H., EARNSHAW, W. C. & LARIONOV, V. 2014. Human artificial chromosome-based gene delivery vectors for biomedicine and biotechnology. *Expert Opin Drug Deliv*, 11, 517-35.
- KOUTNIKOVA, H., CAMPUZANO, V., FOURY, F., DOLLE, P., CAZZALINI, O. & KOENIG, M. 1997. Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nat Genet*, 16, 345-51.
- KRASILNIKOVA, M. M., KIREEVA, M. L., PETROVIC, V., KNIJNIKOVA, N., KASHLEV, M. & MIRKIN, S. M. 2007. Effects of Friedreich's ataxia (GAA)_n(TTC)_n repeats on RNA synthesis and stability. *Nucleic Acids Res*, 35, 1075-1084.
- KUMARI, A., YADAV, S. K. & YADAV, S. C. 2010. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 75, 1-18.
- KUMARI, D., BIACSI, R. E. & USDIN, K. 2011. Repeat expansion affects both transcription initiation and elongation in friedreich ataxia cells. *J Biol Chem*, 286, 4209-15.
- KUMARI, D. & USDIN, K. 2012. Is Friedreich ataxia an epigenetic disorder? *Clin Epigenetics*, 4, 2.
- KUNDAJE, A., MEULEMAN, W., ERNST, J., BILENKY, M., YEN, A., HERAVI-MOUSSAVI, A., KHERADPOUR, P., ZHANG, Z., WANG, J., ZILLER, M. J., AMIN, V., WHITAKER, J. W., SCHULTZ, M. D., WARD, L. D., SARKAR, A., QUON, G., SANDSTROM, R. S., EATON, M. L., WU, Y. C., PFENNING, A. R., WANG, X., CLAUSSNITZER, M., LIU, Y., COARFA, C., HARRIS, R. A., SHORESH, N., EPSTEIN, C. B., GJONESKA, E., LEUNG, D., XIE, W., HAWKINS, R. D., LISTER, R., HONG, C., GASCARD, P., MUNGALL, A. J., MOORE, R., CHUAH, E., TAM, A., CANFIELD, T. K., HANSEN, R. S., KAUL, R., SABO, P. J., BANSAL, M. S., CARLES, A., DIXON, J. R., FARH, K. H., FEIZI, S., KARLIC, R., KIM, A. R., KULKARNI, A., LI, D., LOWDON, R., ELLIOTT, G., MERCER, T. R., NEPH, S. J., ONUCHIC, V., POLAK, P., RAJAGOPAL, N., RAY, P., SALLARI, R. C., SIEBENTHALL, K. T., SINNOTT-ARMSTRONG, N. A., STEVENS, M., THURMAN, R. E., WU, J., ZHANG, B., ZHOU, X., BEAUDET, A. E., BOYER, L. A., DE JAGER, P. L., FARNHAM, P. J., FISHER, S. J., HAUSSLER, D., JONES, S. J., LI, W., MARRA, M. A., MCMANUS, M. T., SUNYAEV, S., THOMSON, J. A., TLSTY, T. D., TSAI, L. H., WANG, W., WATERLAND, R. A., ZHANG, M. Q., CHADWICK, L. H., BERNSTEIN, B. E., COSTELLO, J. F., ECKER, J. R., HIRST, M., MEISSNER, A., MILOSAVLJEVIC, A., REN, B., STAMATOYANNOPOULOS, J. A., WANG, T. & KELLIS, M. 2015. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature*, 518, 317-30.
- LAACKONEN, J. P., ENGLER, T., ROMERO, I. A., WEKSLER, B., COURAUD, P. O., KREPPEL, F. & KOCHANKE, S. 2012. Transcellular targeting of fiber- and hexon-modified

- adenovirus vectors across the brain microvascular endothelial cells in vitro. *PLoS One*, 7, e45977.
- LABELLE, H., TOHME, S., DUHAIME, M. & ALLARD, P. 1986. Natural history of scoliosis in Friedreich's ataxia. *J Bone Joint Surg Am*, 68, 564-72.
- LACHNER, M., O'CARROLL, D., REA, S., MECHTLER, K. & JENUWEIN, T. 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, 410, 116-20.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LEHNERTZ, B., UEDA, Y., DERIJCK, A. A., BRAUNSCHWEIG, U., PEREZ-BURGOS, L., KUBICEK, S., CHEN, T., LI, E., JENUWEIN, T. & PETERS, A. H. 2003. Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol*, 13, 1192-200.
- LENTZ, T. B., GRAY, S. J. & SAMULSKI, R. J. 2012. Viral vectors for gene delivery to the central nervous system. *Neurobiol Dis*, 48, 179-88.
- LEVINE, M. & TJIAN, R. 2003. Transcription regulation and animal diversity. *Nature*, 424, 147-51.
- LI, E., BESTOR, T. H. & JAENISCH, R. 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 69, 915-26.
- LI, H., GAKH, O., SMITH, D. Y. T., RANATUNGA, W. K. & ISAYA, G. 2013. Missense mutations linked to friedreich ataxia have different but synergistic effects on mitochondrial frataxin isoforms. *J Biol Chem*, 288, 4116-27.
- LI, K., BESSE, E. K., HA, D., KOVTUNOVYCH, G. & ROUAULT, T. A. 2008. Iron-dependent regulation of frataxin expression: implications for treatment of Friedreich ataxia. *Hum Mol Genet*, 17, 2265-73.
- LI, K., SINGH, A., CROOKS, D. R., DAI, X., CONG, Z., PAN, L., HA, D. & ROUAULT, T. A. 2010. Expression of human frataxin is regulated by transcription factors SRF and TFAP2. *PLoS One*, 5, e12286.
- LI, Y., POLAK, U., BHALLA, A. D., ROZWADOWSKA, N., BUTLER, J. S., LYNCH, D. R., DENT, S. Y. & NAPIERALA, M. 2015. Excision of Expanded GAA Repeats Alleviates the Molecular Phenotype of Friedreich's Ataxia. *Mol Ther*, 23, 1055-65.
- LIM, F., PALOMO, G. M., MAURITZ, C., GIMENEZ-CASSINA, A., ILLANA, B., WANDOSELL, F. & DIAZ-NIDO, J. 2007. Functional recovery in a Friedreich's ataxia mouse model by frataxin gene transfer using an HSV-1 amplicon vector. *Mol Ther*, 15, 1072-8.
- LIM, S. T., AIRAVAARA, M. & HARVEY, B. K. 2010. Viral vectors for neurotrophic factor delivery: a gene therapy approach for neurodegenerative diseases of the CNS. *Pharmacol Res*, 61, 14-26.
- LIU, H. L., YANG, H. W., HUA, M. Y. & WEI, K. C. 2012. Enhanced therapeutic agent delivery through magnetic resonance imaging-monitored focused ultrasound blood-brain barrier disruption for brain tumor treatment: an overview of the current preclinical status. *Neurosurg Focus*, 32, E4.
- LIU, Y., HUANG, R., HAN, L., KE, W., SHAO, K., YE, L., LOU, J. & JIANG, C. 2009. Brain-targeting gene delivery and cellular internalization mechanisms for modified rabies virus glycoprotein RVG29 nanoparticles. *Biomaterials*, 30, 4195-202.
- LIU, Y. P. & BERKHOUT, B. 2014. HIV-1-based lentiviral vectors. *Methods Mol Biol*, 1087, 273-84.

- LODI, R., COOPER, J. M., BRADLEY, J. L., MANNERS, D., STYLES, P., TAYLOR, D. J. & SCHAPIRA, A. H. 1999. Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in patients with Friedreich ataxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 11492-5.
- LOU, E. 2003. Oncolytic herpes viruses as a potential mechanism for cancer therapy. *Acta Oncol*, 42, 660-71.
- LUGER, K., MADER, A. W., RICHMOND, R. K., SARGENT, D. F. & RICHMOND, T. J. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389, 251-60.
- LUKASHEV, A. N. & ZAMYATNIN, A. A., JR. 2016. Viral Vectors for Gene Therapy: Current State and Clinical Perspectives. *Biochemistry (Mosc)*, 81, 700-8.
- MA, D. 2014. Enhancing endosomal escape for nanoparticle mediated siRNA delivery. *Nanoscale*, 6, 6415-25.
- MAGUIRE, C. A., RAMIREZ, S. H., MERKEL, S. F., SENA-ESTEVEZ, M. & BREAKFIELD, X. O. 2014. Gene therapy for the nervous system: challenges and new strategies. *Neurotherapeutics*, 11, 817-39.
- MAKADIA, H. K. & SIEGEL, S. J. 2011. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)*, 3, 1377-1397.
- MANSERVIGI, R., ARGNANI, R. & MARCONI, P. 2010. HSV Recombinant Vectors for Gene Therapy. *Open Virol J*, 4, 123-56.
- MARCONI, P., MANSERVIGI, R. & EPSTEIN, A. L. 2010. HSV-1-derived helper-independent defective vectors, replicating vectors and amplicon vectors, for the treatment of brain diseases. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 13, 169-83.
- MARMOLINO, D. 2011. Friedreich's ataxia: past, present and future. *Brain Res Rev*, 67, 311-30.
- MARMOLINO, D., MANTO, M., ACQUAVIVA, F., VERGARA, P., RAVELLA, A., MONTICELLI, A. & PANDOLFO, M. 2010. PGC-1α down-regulation affects the antioxidant response in Friedreich's ataxia. *PLoS One*, 5, e10025.
- MASCALCHI, M., BIANCHI, A., CIULLI, S., GINESTRONI, A., AIELLO, M., DOTTI, M. T., SALVI, F., NICOLAI, E., SORICELLI, A. & DICIOTTI, S. 2017. Lower medulla hypoplasia in Friedreich ataxia: MR Imaging confirmation 140 years later. *Journal of Neurology*, 1-3.
- MATTSON, M. P., BARGER, S. W., BEGLEY, J. G. & MARK, R. J. 1995. Calcium, free radicals, and excitotoxic neuronal death in primary cell culture. *Methods Cell Biol*, 46, 187-216.
- MEIJER, D. H., MAGUIRE, C. A., LEROY, S. G. & SENA-ESTEVEZ, M. 2009. Controlling brain tumor growth by intraventricular administration of an AAV vector encoding IFN-beta. *Cancer Gene Ther*, 16, 664-71.
- MILLER, D. S. 2010. Regulation of P-glycoprotein and other ABC drug transporters at the blood-brain barrier. *Trends Pharmacol Sci*, 31, 246-54.
- MOLINA-SERRANO, D., SCHIZA, V. & KIRMIZIS, A. 2013. Cross-talk among epigenetic modifications: lessons from histone arginine methylation. *Biochem Soc Trans*, 41, 751-9.
- MUHLenhoFF, U., RICHHARDT, N., RISTOW, M., KISPAL, G. & LILL, R. 2002. The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins. *Hum Mol Genet*, 11, 2025-36.

- MURR, R. 2010. Interplay between different epigenetic modifications and mechanisms. *Adv Genet*, 70, 101-41.
- MUSSELMAN, C. A., LALONDE, M. E., COTE, J. & KUTATELADZE, T. G. 2012. Perceiving the epigenetic landscape through histone readers. *Nat Struct Mol Biol*, 19, 1218-27.
- NAIK, P. & CUCULLO, L. 2012. In vitro blood-brain barrier models: current and perspective technologies. *J Pharm Sci*, 101, 1337-54.
- NAVARRO, J. A., LLORENS, J. V., SORIANO, S., BOTELLA, J. A., SCHNEUWLY, S., MARTINEZ-SEBASTIAN, M. J. & MOLTO, M. D. 2011. Overexpression of human and fly frataxins in *Drosophila* provokes deleterious effects at biochemical, physiological and developmental levels. *PLoS One*, 6, e21017.
- NOONAN, J. P. & MCCALLION, A. S. 2010. Genomics of long-range regulatory elements. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 11, 1-23.
- NOTTER, T., PANZANELLI, P., PFISTER, S., MIRCSOF, D. & FRITSCHY, J. M. 2014. A protocol for concurrent high-quality immunohistochemical and biochemical analyses in adult mouse central nervous system. *Eur J Neurosci*, 39, 165-75.
- OBERDOERFER, D., LIM, F., KATSU, Y., PEREZ-LUZ, S., MORENO-LORITE, J., LORIA, F., SCOLA, E., MEDINA, J., MUNOZ-BLANCO, J. L. & DIAZ-NIDO, J. 2012. Patient-derived olfactory mucosa stem cells as a model for Friedreich's ataxia. *Febs Journal*, 279, 372-372.
- OBERMEIER, B., DANEMAN, R. & RANSOHOFF, R. M. 2013. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med*, 19, 1584-96.
- OLLER-SALVIA, B., SANCHEZ-NAVARRO, M., GIRALT, E. & TEIXIDO, M. 2016. Blood-brain barrier shuttle peptides: an emerging paradigm for brain delivery. *Chem Soc Rev*, 45, 4690-707.
- PARDRIDGE, W. M. 2005. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx*, 2, 3-14.
- PENG, K. W., PHAM, L., YE, H., ZUFFEREY, R., TRONO, D., COSSET, F. L. & RUSSELL, S. J. 2001. Organ distribution of gene expression after intravenous infusion of targeted and untargeted lentiviral vectors. *Gene Ther*, 8, 1456-63.
- PERDOMINI, M., BELBELLAA, B., MONASSIER, L., REUTENAUER, L., MESSADDEQ, N., CARTIER, N., CRYSTAL, R. G., AUBOURG, P. & PUCCIO, H. 2014. Prevention and reversal of severe mitochondrial cardiomyopathy by gene therapy in a mouse model of Friedreich's ataxia. *Nat Med*, 20, 542-7.
- PEREZ-LUZ, S. & DIAZ-NIDO, J. 2010. Prospects for the use of artificial chromosomes and minichromosome-like episomes in gene therapy. *J Biomed Biotechnol*, 2010.
- PEREZ-LUZ, S., GIMENEZ-CASSINA, A., FERNANDEZ-FRIAS, I., WADE-MARTINS, R. & DIAZ-NIDO, J. 2015. Delivery of the 135 kb human frataxin genomic DNA locus gives rise to different frataxin isoforms. *Genomics*, 106, 76-82.
- PERSIDSKY, Y., RAMIREZ, S. H., HAORAH, J. & KANMOGNE, G. D. 2006. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol*, 1, 223-36.
- POOK, M. A., AL-MAHDAWI, S., CARROLL, C. J., COSSEE, M., PUCCIO, H., LAWRENCE, L., CLARK, P., LOWRIE, M. B., BRADLEY, J. L., COOPER, J. M., KOENIG, M. & CHAMBERLAIN, S. 2001. Rescue of the Friedreich's ataxia knockout mouse by human YAC transgenesis. *Neurogenetics*, 3, 185-93.

- PRADES, R., GUERRERO, S., ARAYA, E., MOLINA, C., SALAS, E., ZURITA, E., SELVA, J., EGEA, G., LOPEZ-IGLESIAS, C., TEIXIDO, M., KOGAN, M. J. & GIRALT, E. 2012. Delivery of gold nanoparticles to the brain by conjugation with a peptide that recognizes the transferrin receptor. *Biomaterials*, 33, 7194-205.
- PRADES, R., OLLER-SALVIA, B., SCHWARZMAIER, S. M., SELVA, J., MOROS, M., BALBI, M., GRAZU, V., DE LA FUENTE, J. M., EGEA, G., PLESNILA, N., TEIXIDO, M. & GIRALT, E. 2015. Applying the retro-enantio approach to obtain a peptide capable of overcoming the blood-brain barrier. *Angew Chem Int Ed Engl*, 54, 3967-72.
- PRISCHI, F., KONAREV, P. V., IANNUZZI, C., PASTORE, C., ADINOLFI, S., MARTIN, S. R., SVERGUN, D. I. & PASTORE, A. 2010. Structural bases for the interaction of frataxin with the central components of iron-sulphur cluster assembly. *Nat Commun*, 1, 95.
- RAMAMOORTHY, M. & NARVEKAR, A. 2015. Non viral vectors in gene therapy- an overview. *J Clin Diagn Res*, 9, Ge01-6.
- RAUCHER, D. & RYU, J. S. 2015. Cell-penetrating peptides: strategies for anticancer treatment. *Trends Mol Med*, 21, 560-70.
- REGINA, A., DEMEULE, M., TRIPATHY, S., LORD-DUFOUR, S., CURRIE, J. C., IDDIR, M., ANNABI, B., CASTAIGNE, J. P. & LACHOWICZ, J. E. 2015. ANG4043, a novel brain-penetrant peptide-mAb conjugate, is efficacious against HER2-positive intracranial tumors in mice. *Mol Cancer Ther*, 14, 129-40.
- REGNER, S. R., LAGEDROST, S. J., PLAPPERT, T., PAULSEN, E. K., FRIEDMAN, L. S., SNYDER, M. L., PERLMAN, S. L., MATHEWS, K. D., WILMOT, G. R., SCHADT, K. A., SUTTON, M. S. & LYNCH, D. R. 2012. Analysis of echocardiograms in a large heterogeneous cohort of patients with friedreich ataxia. *Am J Cardiol*, 109, 401-5.
- RILEY, M. K. & VERMERRIS, W. 2017. Recent Advances in Nanomaterials for Gene Delivery-A Review. *Nanomaterials (Basel)*, 7.
- RIVERA, C. M. & REN, B. 2013. Mapping human epigenomes. *Cell*, 155, 39-55.
- RODRIGUES, A. F., FORMAS-OLIVEIRA, A. S., BANDEIRA, V. S., ALVES, P. M., HU, W. S. & COROADINHA, A. S. 2013. Metabolic pathways recruited in the production of a recombinant enveloped virus: mining targets for process and cell engineering. *Metab Eng*, 20, 131-45.
- ROGERS, M. L. & RUSH, R. A. 2012. Non-viral gene therapy for neurological diseases, with an emphasis on targeted gene delivery. *J Control Release*, 157, 183-9.
- RUNGTA, R. L., CHOI, H. B., LIN, P. J., KO, R. W., ASHBY, D., NAIR, J., MANOHARAN, M., CULLIS, P. R. & MACVICAR, B. A. 2013. Lipid Nanoparticle Delivery of siRNA to Silence Neuronal Gene Expression in the Brain. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2, e136.
- SACCA, F., PUORRO, G., ANTENORA, A., MARSILI, A., DENARO, A., PIRO, R., SORRENTINO, P., PANE, C., TESSA, A., BRESCIA MORRA, V., COCOZZA, S., DE MICHELE, G., SANTORELLI, F. M. & FILLA, A. 2011. A combined nucleic acid and protein analysis in Friedreich ataxia: implications for diagnosis, pathogenesis and clinical trial design. *PLoS One*, 6, e17627.
- SAEKI, Y., FRAEFEL, C., ICHIKAWA, T., BREAKEFIELD, X. O. & CHIOCCA, E. A. 2001. Improved helper virus-free packaging system for HSV amplicon vectors using an ICP27-deleted, oversized HSV-1 DNA in a bacterial artificial chromosome. *Mol Ther*, 3, 591-601.

- SAH, H., THOMA, L. A., DESU, H. R., SAH, E. & WOOD, G. C. 2013. Concepts and practices used to develop functional PLGA-based nanoparticulate systems. *Int J Nanomedicine*, 8, 747-65.
- SAHDEO, S., SCOTT, B. D., MCMACKIN, M. Z., JASOLIYA, M., BROWN, B., WULFF, H., PERLMAN, S. L., POOK, M. A. & CORTOPASSI, G. A. 2014. Dyclonine rescues frataxin deficiency in animal models and buccal cells of patients with Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet*, 23, 6848-62.
- SAKAMOTO, N., OHSHIMA, K., MONTERMINI, L., PANDOLFO, M. & WELLS, R. D. 2001. Sticky DNA, a self-associated complex formed at long GAA*TTC repeats in intron 1 of the frataxin gene, inhibits transcription. *J Biol Chem*, 276, 27171-7.
- SALVADOR, E., SHITYAKOV, S. & FORSTER, C. 2014. Glucocorticoids and endothelial cell barrier function. *Cell Tissue Res*, 355, 597-605.
- SAMARANCH, L., SALEGIO, E. A., SAN SEBASTIAN, W., KELLS, A. P., BRINGAS, J. R., FORSAYETH, J. & BANKIEWICZ, K. S. 2013. Strong cortical and spinal cord transduction after AAV7 and AAV9 delivery into the cerebrospinal fluid of nonhuman primates. *Hum Gene Ther*, 24, 526-32.
- SANCHEZ-NAVARRO, M., GIRALT, E. & TEIXIDO, M. 2017. Blood-brain barrier peptide shuttles. *Curr Opin Chem Biol*, 38, 134-140.
- SARAIVA, J., NOBRE, R. J. & PEREIRA DE ALMEIDA, L. 2016. Gene therapy for the CNS using AAVs: The impact of systemic delivery by AAV9. *J Control Release*, 241, 94-109.
- SARSERO, J. P., HOLLOWAY, T. P., LI, L., FINKELSTEIN, D. I. & IOANNOU, P. A. 2014. Rescue of the Friedreich ataxia knockout mutation in transgenic mice containing an FXN-EGFP genomic reporter. *PLoS One*, 9, e93307.
- SARSERO, J. P., LI, L., HOLLOWAY, T. P., VOULLAIRE, L., GAZEAS, S., FOWLER, K. J., KIRBY, D. M., THORBURN, D. R., GALLE, A., CHEEMA, S., KOENIG, M., WILLIAMSON, R. & IOANNOU, P. A. 2004. Human BAC-mediated rescue of the Friedreich ataxia knockout mutation in transgenic mice. *Mamm Genome*, 15, 370-82.
- SAVELIEV, A., EVERETT, C., SHARPE, T., WEBSTER, Z. & FESTENSTEIN, R. 2003. DNA triplet repeats mediate heterochromatin-protein-1-sensitive variegated gene silencing. *Nature*, 422, 909-13.
- SCHMUCKER, S., ARGENTINI, M., CARELLE-CALMELS, N., MARTELLI, A. & PUCCIO, H. 2008. The in vivo mitochondrial two-step maturation of human frataxin. *Hum Mol Genet*, 17, 3521-31.
- SEMETE, B., BOOYSEN, L., LEMMER, Y., KALOMBO, L., KATATA, L., VERSCHOOR, J. & SWAI, H. S. 2010. In vivo evaluation of the biodistribution and safety of PLGA nanoparticles as drug delivery systems. *Nanomedicine*, 6, 662-71.
- SHAN, Y., SCHOENFELD, R. A., HAYASHI, G., NAPOLI, E., AKIYAMA, T., IODI CARSTENS, M., CARSTENS, E. E., POOK, M. A. & CORTOPASSI, G. A. 2013. Frataxin deficiency leads to defects in expression of antioxidants and Nrf2 expression in dorsal root ganglia of the Friedreich's ataxia YG8R mouse model. *Antioxid Redox Signal*, 19, 1481-93.
- SHAW, A. & CORNETTA, K. 2014. Design and Potential of Non-Integrating Lentiviral Vectors. *Biomedicines*, 2, 14-35.
- SHILLITOE, E. J. 2009. Gene therapy: the end of the rainbow? *Head Neck Oncol*, 1, 7.

- SHIMIZU, R., LAN, N. N., TAI, T. T., ADACHI, Y., KAWAZOE, A., MU, A. & TAKETANI, S. 2014. p53 directly regulates the transcription of the human frataxin gene and its lack of regulation in tumor cells decreases the utilization of mitochondrial iron. *Gene*, 551, 79-85.
- SHIVE, M. S. & ANDERSON, J. M. 1997. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev*, 28, 5-24.
- SHOGREN-KNAAK, M., ISHII, H., SUN, J. M., PAZIN, M. J., DAVIE, J. R. & PETERSON, C. L. 2006. Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science*, 311, 844-7.
- SLOAN, C. A., CHAN, E. T., DAVIDSON, J. M., MALLADI, V. S., STRATTAN, J. S., HITZ, B. C., GABDANK, I., NARAYANAN, A. K., HO, M., LEE, B. T., ROWE, L. D., DRESZER, T. R., ROE, G., PODDUTURI, N. R., TANAKA, F., HONG, E. L. & CHERRY, J. M. 2016. ENCODE data at the ENCODE portal. *Nucleic Acids Res*, 44, D726-32.
- SPENCER, B., VALERA, E., ROCKENSTEIN, E., TREJO-MORALES, M., ADAME, A. & MASLIAH, E. 2015. A brain-targeted, modified neurosin (kallikrein-6) reduces alpha-synuclein accumulation in a mouse model of multiple system atrophy. *Mol Neurodegener*, 10, 48.
- SUN, X. & ZHANG, N. 2010. Cationic polymer optimization for efficient gene delivery. *Mini Rev Med Chem*, 10, 108-25.
- TAHARA, K., SAKAI, T., YAMAMOTO, H., TAKEUCHI, H. & KAWASHIMA, Y. 2008. Establishing chitosan coated PLGA nanosphere platform loaded with wide variety of nucleic acid by complexation with cationic compound for gene delivery. *Int J Pharm*, 354, 210-6.
- TAKAI, D. & JONES, P. A. 2002. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 3740-5.
- TAKEUCHI, T. & FUTAKI, S. 2016. Current Understanding of Direct Translocation of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides and Its Internalization Mechanisms. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 64, 1431-1437.
- TAYLOR, T. N., POTGIETER, D., ANWAR, S., SENIOR, S. L., JANEZIC, S., THRELFELL, S., RYAN, B., PARKKINEN, L., DELTHEIL, T., CIOROC, M., LIVIERATOS, A., OLIVER, P. L., JENNINGS, K. A., DAVIES, K. E., ANSORGE, O., BANNERMAN, D. M., CRAGG, S. J. & WADE-MARTINS, R. 2014. Region-specific deficits in dopamine, but not norepinephrine, signaling in a novel A30P alpha-synuclein BAC transgenic mouse. *Neurobiol Dis*, 62, 193-207.
- TEIXIDO, M. & GIRALT, E. 2008. The role of peptides in blood-brain barrier nanotechnology. *J Pept Sci*, 14, 163-73.
- THEVENOT, E., JORDAO, J. F., O'REILLY, M. A., MARKHAM, K., WENG, Y. Q., FOUST, K. D., KASPAR, B. K., HYNENEN, K. & AUBERT, I. 2012. Targeted delivery of self-complementary adeno-associated virus serotype 9 to the brain, using magnetic resonance imaging-guided focused ultrasound. *Hum Gene Ther*, 23, 1144-55.
- THOMAS, D. J., ROSENBLOOM, K. R., CLAWSON, H., HINRICHS, A. S., TRUMBOWER, H., RANEY, B. J., KAROLCHIK, D., BARBER, G. P., HARTE, R. A., HILLMAN-JACKSON, J., KUHN, R. M., RHEAD, B. L., SMITH, K. E., THAKKAPALLAYIL, A., ZWEIG, A. S., HAUSSLER, D. & KENT, W. J. 2007. The ENCODE Project at UC Santa Cruz. *Nucleic Acids Res*, 35, D663-7.

- TRELEAVEN, C. M., TAMSETT, T. J., BU, J., FIDLER, J. A., SARDI, S. P., HURLBUT, G. D., WOODWORTH, L. A., CHENG, S. H., PASSINI, M. A., SHIHABUDDIN, L. S. & DODGE, J. C. 2012. Gene transfer to the CNS is efficacious in immune-primed mice harboring physiologically relevant titers of anti-AAV antibodies. *Mol Ther*, 20, 1713-23.
- TUNNEMANN, G., TER-AVETISYAN, G., MARTIN, R. M., STOCKL, M., HERRMANN, A. & CARDOSO, M. C. 2008. Live-cell analysis of cell penetration ability and toxicity of oligo-arginines. *J Pept Sci*, 14, 469-76.
- VAN DER VOS, K. E., BALAJ, L., SKOG, J. & BREAKFIELD, X. O. 2011. Brain tumor microvesicles: insights into intercellular communication in the nervous system. *Cell Mol Neurobiol*, 31, 949-59.
- VANKAN, P. 2013. Prevalence gradients of Friedreich's ataxia and R1b haplotype in Europe co-localize, suggesting a common Palaeolithic origin in the Franco-Cantabrian ice age refuge. *J Neurochem*, 126 Suppl 1, 11-20.
- VERLENGIA, G., MIYAGAWA, Y., INGUSCI, S., COHEN, J. B., SIMONATO, M. & GLORIOSO, J. C. 2017. Engineered HSV vector achieves safe long-term transgene expression in the central nervous system. *Sci Rep*, 7, 1507.
- VERT, M., MAUDUIT, J. & LI, S. 1994. Biodegradation of PLA/GA polymers: increasing complexity. *Biomaterials*, 15, 1209-13.
- VINOGRADOV, S. V., BRONICH, T. K. & KABANOV, A. V. 2002. Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells. *Adv Drug Deliv Rev*, 54, 135-47.
- WADE-MARTINS, R., SMITH, E. R., TYMINSKI, E., CHIOCCA, E. A. & SAEKI, Y. 2001. An infectious transfer and expression system for genomic DNA loci in human and mouse cells. *Nat Biotechnol*, 19, 1067-70.
- WANG, D., EL-AMOURI, S. S., DAI, M., KUAN, C. Y., HUI, D. Y., BRADY, R. O. & PAN, D. 2013. Engineering a lysosomal enzyme with a derivative of receptor-binding domain of apoE enables delivery across the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 2999-3004.
- WANG, L., HAO, Y., LI, H., ZHAO, Y., MENG, D., LI, D., SHI, J., ZHANG, H., ZHANG, Z. & ZHANG, Y. 2015. Co-delivery of doxorubicin and siRNA for glioma therapy by a brain targeting system: angiopep-2-modified poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles. *J Drug Target*, 23, 832-46.
- WITCHER, M. & EMERSON, B. M. 2009. Epigenetic silencing of the p16(INK4a) tumor suppressor is associated with loss of CTCF binding and a chromatin boundary. *Mol Cell*, 34, 271-84.
- XIA, H., CAO, Y., DAI, X., MARELJA, Z., ZHOU, D., MO, R., AL-MAHDAWI, S., POOK, M. A., LEIMKUHLE, S., ROUAULT, T. A. & LI, K. 2012. Novel frataxin isoforms may contribute to the pathological mechanism of Friedreich ataxia. *PLoS One*, 7, e47847.
- YAMAMOTO, Y., NAGASATO, M., YOSHIDA, T. & AOKI, K. 2017. Recent Advances in Genetic Modification of Adenovirus Vectors for Cancer Treatment. *Cancer Sci*.
- YANDIM, C., NATISVILI, T. & FESTENSTEIN, R. 2013. Gene regulation and epigenetics in Friedreich's ataxia. *J Neurochem*, 126 Suppl 1, 21-42.
- YLA-HERTTUALA, S. 2012. Endgame: glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European union. *Mol Ther*, 20, 1831-2.

- ZHANG, H. G., ZHUANG, X., SUN, D., LIU, Y., XIANG, X. & GRIZZLE, W. E. 2012. Exosomes and immune surveillance of neoplastic lesions: a review. *Biotech Histochem*, 87, 161-8.
- ZHUANG, X., XIANG, X., GRIZZLE, W., SUN, D., ZHANG, S., AXTELL, R. C., JU, S., MU, J., ZHANG, L., STEINMAN, L., MILLER, D. & ZHANG, H. G. 2011. Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Mol Ther*, 19, 1769-79.

ANEXO